

---

# BACHELORARBEIT

---

Frau  
**Evelyn Rother**

Herstellung und Charakterisierung von  
scFv's gegen den Phytohormonrezeptor  
RCAR1

Mittweida, 2011

---

# **BACHELORARBEIT**

---

## **Herstellung und Charakterisierung von scFv's gegen den Phytohormonrezeptor RCAR1**

Autor:

**Frau  
Evelyn Rother**

Studiengang:

**Biotechnologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:

**BI08w2-B**

Erstprüfer:

**Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:

**PD Dr. rer. nat. habil. Udo Conrad**

Einreichung:

**Mittweida, 26.09.2011**

Verteidigung/Bewertung:

**Mittweida, 2011**

# Bibliografische Beschreibung

Rother, Evelyn:

Herstellung und Charakterisierung von scFv's gegen den Phytohormonrezeptor RCAR1. – 2011. - VII, 63.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2011

## Referat

Die vorliegende Bachelorarbeit befasst sich mit der Herstellung, Reinigung sowie der physischen und funktionellen Charakterisierung von Einkettenantikörpern (scFv's) gegen den Abscisinsäure-Rezeptor RCAR1 (regulatory components of ABA receptor). Dabei besteht das Hauptziel darin, einen Beitrag zum Verständnis der Abscisinsäure (ABA) vermittelten Signaltransduktion zu leisten. ABA ist ein zentraler Regulator bei der Reaktion auf Stress und spielt außerdem in zahlreichen Entwicklungsstadien der Pflanze eine Rolle. Derzeit ist noch offen, ob die 14 entdeckten ABA-Rezeptoren über eine spezielle Funktion verfügen, was beispielsweise durch eine Immunmodulation untersucht werden kann. Dafür werden spezifische und hoch affine Antikörper bzw. Antikörperfragmente benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Herstellung von spezifischen scFv's gegen den Rezeptor RCAR1 eine Erzeugung von Dimeren angestrebt. Die Expression der scFv's erfolgte in *N. benthamiana*. Die Proteine wurden affinitätschromatographisch gereinigt. Für die physische Charakterisierung wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Bindungseigenschaften wurden mit Hilfe verschiedener ELISA-Experimente charakterisiert.

## **Vorbemerkung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Bachelorstudiengangs Biotechnologie/Bioinformatik an der Hochschule Mittweida am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben angefertigt.

Mein Dank geht zuerst an PD Dr. Udo Conrad, der das Thema stellte und die Arbeit sachkundig betreute. Von Seiten der Hochschule danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Röbbke Wünschiers für die Unterstützung. Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Phytoantikörper des IPK, besonders an Silke Krause und Isolde Tillack für die technische Unterstützung und alle methodischen Ratschläge. Bei allen Mitarbeitern des IPK möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die allgemeine Hilfsbereitschaft bedanken. Meiner Familie danke ich für die moralische Unterstützung.

## Inhalt

### Inhalt I

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Antikörper und Antikörperfragmente .....</i>	<i>1</i>
1.1.1 Die Rolle von Antikörperfragmenten bei der Immunmodulation .....	5
1.2 <i>Die Rolle von N. benthamiana in der Pflanzenbiotechnologie .....</i>	<i>6</i>
1.3 <i>Abscisinsäure (ABA) und ABA-Rezeptoren .....</i>	<i>7</i>
1.4 <i>Ziel der Arbeit .....</i>	<i>11</i>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Material.....</i>	<i>12</i>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	12
2.1.2 Medien und Puffer .....	12
2.1.2.1 Medien .....	12
2.1.2.2 Puffer und Lösungen .....	13
2.1.3 Standards und Kits.....	15
2.1.4 Antibiotika.....	15
2.1.5 Bakterienstämme .....	15
2.1.6 Plasmide .....	16
2.1.7 Antikörper und Antigene .....	16
2.1.8 Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme und dafür verwendete Puffer .....	16
2.1.9 Geräte .....	17
2.2 <i>Methoden.....</i>	<i>18</i>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1.1 PCR .....	18
2.2.1.2 Hydrolytische Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	19
2.2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA .....	20
2.2.1.4 Ligation .....	20
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.2.1.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten .....	21
2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation) .....	22
2.2.2 Produktion rekombinanter Proteine.....	22
2.2.2.1 Transformation mittels Elektroporation .....	22

2.2.2.2	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> durch Injektion .....	23
2.2.2.3	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> durch Infiltration .....	24
2.2.2.4	Proteinerte und Aufarbeitung .....	24
2.2.2.5	Reinigung von Proteinen durch Ni-NTA Agarose .....	25
2.2.3	Biochemische Methoden .....	26
2.2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	26
2.2.3.3	Western Blot mit anschließender Immunfärbung .....	27
2.2.3.4	Coomassie-Färbung.....	28
2.2.4	ELISA.....	29
2.2.4.1	Indirekter ELISA .....	29
2.2.4.2	Kompetitiver ELISA .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Auswertung.....</b>	<b>31</b>
3.1	<i>Konstrukterstellung .....</i>	<i>31</i>
3.2	<i>Proteingewinnung – und Analyse.....</i>	<i>40</i>
3.3	<i>Charakterisierung der Proteine .....</i>	<i>43</i>
3.3.1	Physische Charakterisierung .....	43
3.3.2	Funktionelle Charakterisierung .....	45
3.3.2.1	Bestimmung des Sättigungsbereichs und der Dissoziationskonstante von anti-RCAR1 durch indirekte ELISA-Experimente .....	45
3.3.2.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten von anti-RCAR1 durch kompetitive ELISA-Experimente .....	49
3.3.2.3	Weitere ELISA-Experimente zur Untersuchung der niedrigen Bindungsaffinität.....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>64</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>70</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....	2
Abbildung 2: IgG-Antikörper und proteolytische Spaltprodukte. ....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung rekombinanter Antikörperfragmente.....	4
Abbildung 4: 4a: Struktureller Mechanismus der ABA-Wirkung. 4b: ABA vermittelte Signaltransduktion. ....	9
Abbildung 5: Schließzellen mit umliegenden Epidermiszellen. (Quelle: www.botanik.wzw.tum.de) .....	10
Abbildung 6: Aminosäuresequenz von <i>anti</i> -RCAR-scFv-ck. Restriktionsschnittstellen: <i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I, <i>Not</i> I. ....	31
Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese der Spaltung von pRTRA mit <i>Bam</i> H1, <i>Xho</i> 1 und <i>Not</i> 1. ....	37
Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pRTRA mit <i>Hind</i> III.....	37
Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pCB301 (aus <i>E.coli</i> ) mit <i>Hind</i> III.....	38
Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pCB301 (in <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> ) mit <i>Hind</i> III.....	39
Abbildung 15: Western Blot Analyse nach Injektion von <i>N. benthamiana</i> . ....	40
Abbildung 16: Proteinmenge in den Eluaten der gereinigten scFv's. ....	41
Abbildung 17: Coomassie-Färbung der Proteinreinigung. ....	42
Abbildung 18: Western Blot der Proteinreinigung. ....	42
Abbildung 20: indirekter ELISA zur Ermittlung des Sättigungsbereichs. ....	45
Abbildung 21: Ergebnisse von indirekten ELISA-Studien mit verschiedenen Antigenen. .....	46
Abbildung 22: Sättigungskurve des anti-RCAR1-scFv und anti-RCAR1-scFv-ck.....	48
Abbildung 23: Spezifische Aktivität von anti-RCAR1-scFv-ck bei verschiedenen Antigenen.....	50
Abbildung 24: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten. ....	51
Abbildung 25: Bindung von anti-RCAR-scFv-ck an RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 im kompetitiven ELISA. ....	52
Abbildung 26: Untersuchung der Bindung von anti-RCAR-scFv-ck an eine Komponente des Rohextrakts im indirekten ELISA. ....	54
Abbildung 27: Nachweis der Bindung von <i>anti</i> -RCAR-scFv im Rohextrakt von <i>N.</i> <i>benthamiana</i> mittels indirektem ELISA. ....	55

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....	12
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Medien .....	13
Tabelle 3: Puffer und Lösungen für SDS Page, Coomassie-Färbung und Western Blot ..	13
Tabelle 4: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese. ....	14
Tabelle 5: Puffer und Lösungen für den ELISA. ....	14
Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Minipräparation. ....	14
Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung. ....	14
Tabelle 8: Standards und Kits .....	15
Tabelle 9: Antibiotika .....	15
Tabelle 10: Bakterienstämme .....	15
Tabelle 11: Plasmide .....	16
Tabelle 12: Antikörper und Antigene .....	16
Tabelle 13: Restriktions- und Ligationsenzyme .....	16
Tabelle 14: Geräte .....	17
Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenn- und Samelgel für ein SDS-PAA-Gel. ....	27
Tabelle 16: spezifische Primer für die PCR.....	33
Tabelle 17: Ablauf der PCR.....	34
Tabelle 18: Zusammensetzung der PCR Ansätze 1-4.....	35
Tabelle 19: Detaillierter Ablauf der Fusions-PCR.....	35
Tabelle 20: Proteinmenge an Tag 4 und 5 der mittels Injektion vorübergehend transformierten Pflanzen. ....	40
Tabelle 22: Prozentualer Unterschied zwischen anti-RCAR-scFv und in Rohextrakt inkubierten anti-RCAR-scFv. ....	55



# Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
A. tumefaciens	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABRE	<i>ABA-responsive promotor elements</i>
ALP	Alaklische Phosphatase
Anti-c-myc	Antikörper, gerichtet gegen c-myc <i>tag</i> von Proteinen
Anti-Maus-ALP	Antikörper aus Kaninchen gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase
AP	Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virs
CDR	complementary determining regions
Dest. Wasser	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KDEL	Lys-Asp-Glu-Leu
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonucleic acid (messenger-Ribonukleinsäure)
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Ni-NTA	Nickel- nitrilotriacetic acid
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)

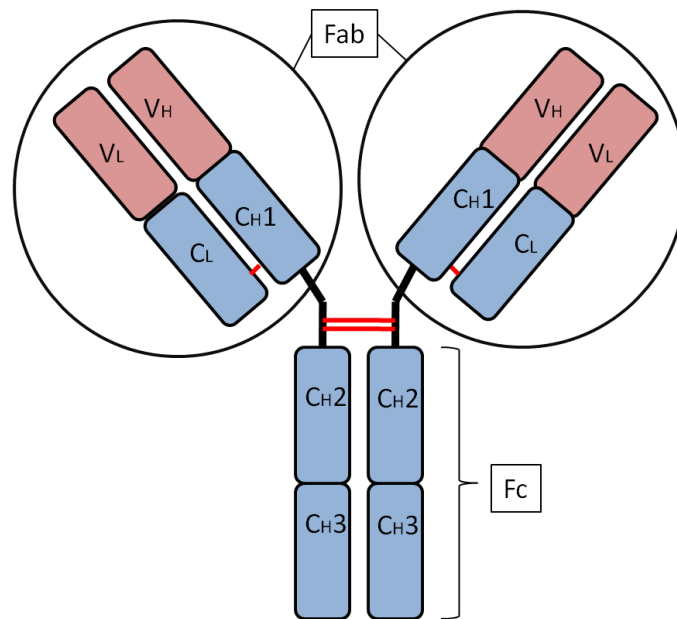
PBS-T	PBS-Tween 20
pNPP	para-Nitrophenolphosphat
POD	Peroxidase
PP2C	Proteinphosphatase des Typs 2C
PYL	PYR1-like proteins
PYR	pyrabactin resistance 1
RCAR	regulatory components of ABA receptor
RNase	Ribonuklease
scFv	single chain Fv
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAA	SDS-Polyacrylamid
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylbenzidin
V <sub>H</sub>	variable Domäne der schweren Kette eines IgG-Antikörpers
V <sub>H</sub> H	variable Domäne eines cameliden Antikörpers
V <sub>L</sub>	variable Domäne der leichten Kette eines IgG-Antikörpers

# 1 Einleitung

## 1.1 Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper und Antikörperfragmente gewinnen in der Biochemie und Zellbiologie zunehmend an Bedeutung. Die Anwendung reicht vom einfachen diagnostischen Reagenz zu Forschungszwecken bis hin zum hochwirksamen Biopharmazeutikum (Holliger *et al.*, 2005).

Antikörper bestehen aus zwei schweren Ketten (H-Ketten = heavy chains) und zwei leichten Ketten (L-Ketten = light chains), die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Anhand ihrer schweren Ketten lassen sich fünf Klassen an Immunglobulinen unterscheiden: IgM, IgG, IgD, IgA und IgE Antikörper. Immunglobuline des Typs IgG stellen den größten Anteil an humanen Antikörpern dar. Die Gesamtmasse eines IgG-Moleküls beträgt etwa 150 kDa. Die beiden leichten Ketten ( $V_L$ ,  $C_L$ ) sind abhängig von Organismus und Immunglobulin-Subklasse entweder vom Typ kappa oder lambda. Zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion liegenden Anteil der schweren Kette ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ) bilden sie im IgG-Molekül das sogenannte *Fab*-Fragment. Dieses sorgt für die Bindung des Antigens. Mit Hilfe des Enzyms Papain kann es von dem darunterliegenden kristallinen *Fc*-Fragment ( $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) abgespalten werden. Der Zusammenhalt der vier Proteinketten erfolgt über Disulfidbrücken, einerseits zwischen den Domänen  $C_L$  und  $C_{H1}$  der leichten und schweren Kette und andererseits zwischen den beiden schweren Ketten im Bereich der Gelenkregion/Hinge-Region. (Janway *et al.*, 2002) Eine schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers ist in Abbildung 1 zu sehen.



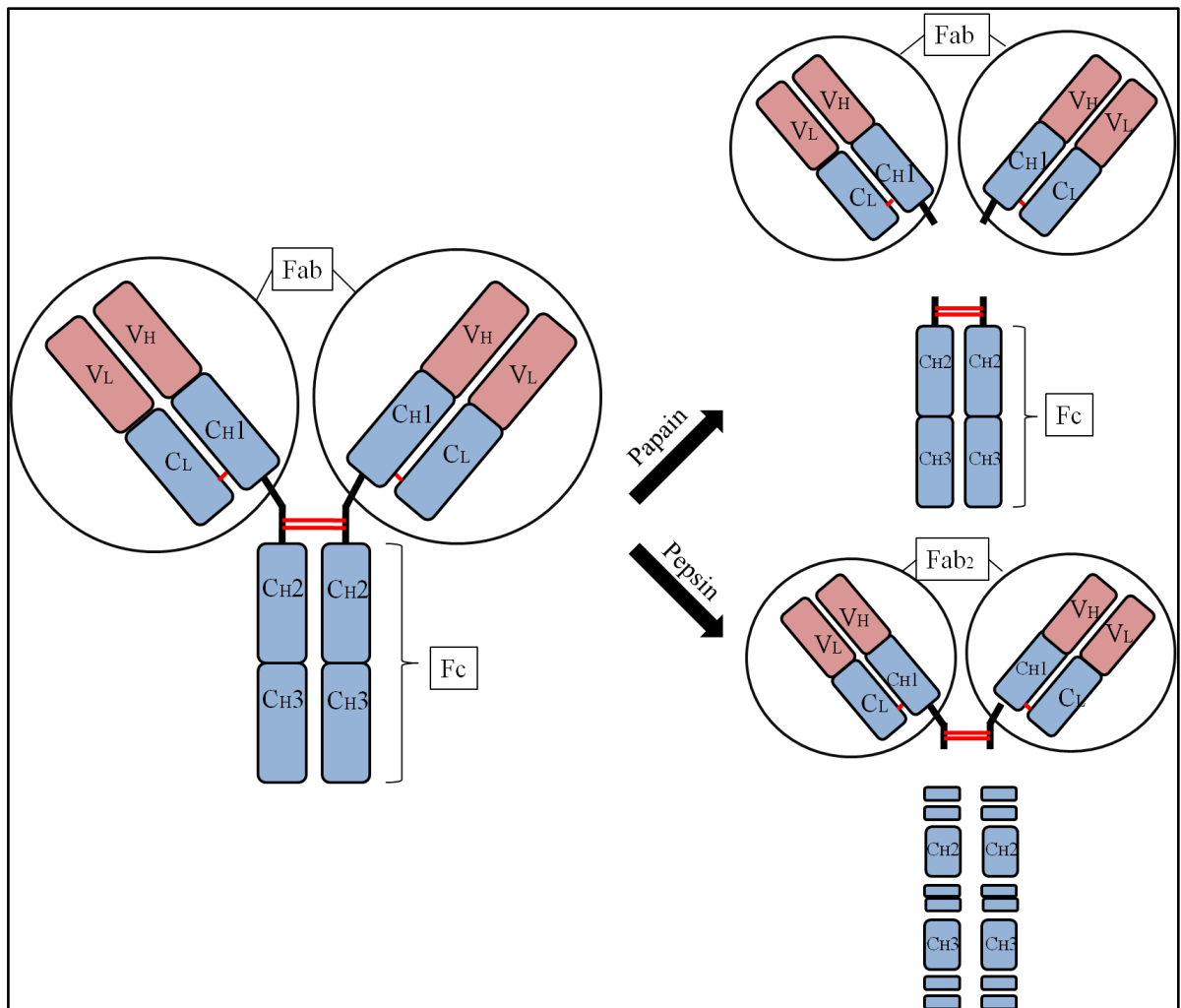
**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.**

IgG: Immunglobulin G; V<sub>L</sub>: variable Domäne der leichten Kette; V<sub>H</sub>: variable Domäne der schweren Kette; C<sub>L</sub>: konstante Domäne der leichten Kette, C<sub>H</sub>: konstante Domäne der schweren Kette

Therapeutische Antikörper werden heute als monoklonale Antikörper hergestellt (Köhler *et al.*, 1975). Die Fusion einer antikörperproduzierenden B-Plasmazelle mit einer immortalen Myelomzelle erzeugt sogenannte Hybridomzellen, wodurch eine unsterbliche Antikörper-produzierende Hybridomzelllinie erzeugt wird. Die Selektion monoklonaler Antikörper erfolgt daher über Hybridomatechnologie. Weiterhin kann über Phage Display-Technologien und anschließendes molekulares Design von kompletten Antikörpermolekülen mit humanen konstanten Teilen eine Selektion monoklonaler Antikörper erfolgen. Mittels Phage-Display konnten erstmals auch rekombinante Antikörperfragmente gegen ein spezifisches Antigen selektiert werden. Dabei können sowohl herkömmliche Antigene als auch *in vivo* toxisch- wirkende Antigene verwendet werden, was die Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern mit neuen Eigenschaften eröffnet. Die Produktion monoklonaler Antikörper erfolgt in optimierten Zelllinien (z.B. CHO-Zellen) unter darauf eingestellten Bedingungen in Großfermentern für tierische Zellen. Zellkulturen dieser Art sind für solch eine Produktion nicht leicht zu halten. Daher ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern teuer. Kleinere Proteine sind leichter in der Herstellung und Handhabung und haben zudem gewisse Vorteile, beispielsweise für die Gewebedurchdringung und die Tumordiagnose und -therapie.

Daher entstand die Idee nur Fragmente von Antikörpern zu erzeugen, die Antigene ebenso blockieren und binden wie Antikörper. Ein IgG-Antikörper kann durch proteolytische

Enzyme in verschiedene Fragmente gespalten werden. So zerfällt ein Immunglobulinmolekül durch die Thiolprotease Papain in ein Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente (siehe Abb. 2). Die Fab-Fragmente enthalten die komplette antigenbindende Region des ursprünglichen Antikörpers. Durch das Enzym Pepsin wird ein Antikörpermolekül ebenfalls im Bereich der Hinge-Region gespalten, jedoch so, dass nur einziges Fab<sub>2</sub>-Fragment entsteht, welches beide antigenbindenden Arme enthält (siehe Abb. 2). Der Fc-Teil wird proteolytisch in mehrere kleine Stücke gespalten.

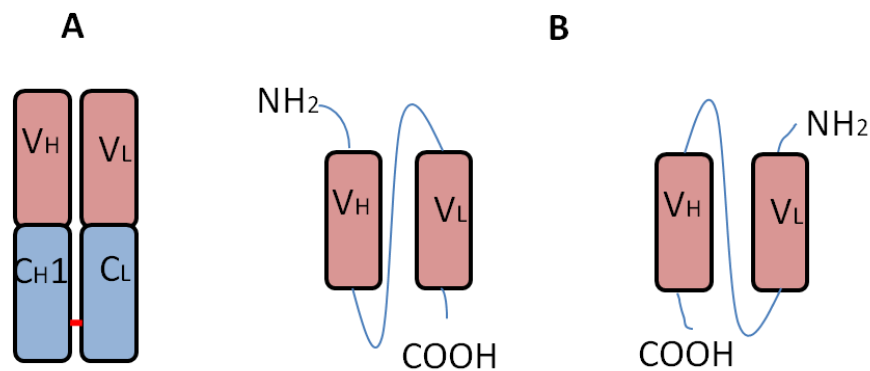


**Abbildung 2: IgG-Antikörper und proteolytische Spaltprodukte.**

Spaltung mit Papain: Entstehung von 2 Fab-Fragmenten und einem Fc-Fragment. Spaltung mit Pepsin: Entstehung eines Fab<sub>2</sub>-Fragments, CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> – Domänen zerfallen in mehrere Teile

Antikörperfragmente können auch mit Hilfe von gentechnischen Methoden hergestellt werden (Conrad und Scheller *et al.*, 2005). Für solche rekombinanten Fragmente wird die entsprechende DNA-Sequenz in einen speziellen Expressionsvektor kloniert und in *E.coli*, Hefe oder transgenen Pflanzen exprimiert. Neben Fab-Fragmenten können auch andere

Antikörperfragmente erstellt werden, so z.B. Fv-Fragmente, die kleinsten funktionsfähigen, antigenbindenden Moleküle, die nur aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bestehen (siehe Abb. 3). Die beiden Domänen sind jedoch nicht kovalent miteinander verbunden, weshalb sie meist über eine Disulfidbrücke (dsFc) oder ein Linkerpeptid (scFv) miteinander verknüpft werden (Bird *et al.*, 1988). Der Polypeptidlinker zwischen  $V_H$  und  $V_L$  bei scFv-Fragmenten besteht meist aus Glycin und Serin-Molekülen. Ist dieser Linker kürzer als 15 Aminosäuren, neigen die scFv-Fragmente dazu Dimere oder Trimere auszubilden. Die  $V_L$ -Domäne eines scFv-Fragments interagiert dafür mit der  $V_H$ -Domäne eines weiteren scFv-Fragments. Ein scFv wird nur durch ein Gen kodiert, wodurch gewährleistet ist, dass die schwere und die leichte Kette in vergleichbaren Konzentrationen exprimiert werden. Ein monomeres scFv hat eine Größe von rund 26 kDa. Der Vorteil von scFv's liegt in der vergleichbaren Aktivität zu einem konventionellen Antikörper und der hohen Stabilität.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung rekombinanter Antikörperfragmente.**

**A** Fab-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen und je einer konstanten Domäne der leichten und schweren Kette. **B** ScFv-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette, verbunden durch einen Polypeptidlinker.

Dimere Antikörpermoleküle mit zwei Antigenbindungsportoren verfügen oft über eine höhere Avidität. Außerdem erlauben sie eine Vernetzung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Solche Dimere können über Fc-Fusionen erzeugt werden und wurden schon erfolgreich in Pflanzen exprimiert (Van Droogenbroeck *et al.*, 2007). Für die Dimerisierung können scFv's auch mit der konstanten Region der humanen kappa-leichten Kette ( $\kappa$ ) verbunden werden. Dimere von leichten Ketten sind als „Bence-Jones-Proteine“ bekannt. Diese werden nur bei einem multiplen Myelom im Urin bei manchen Non-Hodkin-Lymphom Patienten ausgeschieden (Bence-Jones, 1848). Ein transformierter

Plasmazellklon produziert unvollständige, funktionslose Antikörper, die nicht über Disulfidbrücken mit den schweren Ketten verbunden sind. Allerdings enthalten sie als Bestandteil eines tetrameren Antikörpers Cystein, was für die Disulfidbindung zur passenden schweren Kette verantwortlich ist. Dasselbe Cystein scheint ebenfalls an der Bildung von kovalent gebundenen  $\kappa$ -Ketten-Dimeren beteiligt zu sein. Dimere von Nanobodies fusioniert mit c $\kappa$  wurden bereits erfolgreich in Pflanzen exprimiert und wiesen verbesserte Bindungseigenschaften im Vergleich zu den Monomeren auf. Dies bezog sich auch auf die Neutralisierung des Antigens (Giersberg *et al.* 2011).

### **1.1.1 Die Rolle von Antikörperfragmenten bei der Immunmodulation**

Das spezifische Bindeverhalten von Antikörpern kann genutzt werden, um ein intrazelluläres Target bzw. Antigen, z.B. lösliche oder membrangebundene Rezeptoren, Enzyme, Sekundärmetabolite, Phytohormone oder Toxine zu binden und in ihrer Funktion zu behindern. Der Funktionsverlust wird durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen hervorgerufen. Diese Komplexbildung führt zu einer sterischen Veränderung der molekularen Struktur. Die Blockierung von funktionellen Molekülen in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle liefert wichtige Kenntnisse über deren Funktion und führt damit zum besseren Verständnis von Stoffwechselprozessen, Signaltransduktionswegen oder Pathogen-Infektionen. Die molekulare Technik, die sich hinter diesen Untersuchungen verbirgt, wird als Immunmodulation bezeichnet. Am häufigsten wird bei der Immunmodulation mit scFv's gearbeitet, doch auch andere Antikörperfragmente, wie Fab-Fragmente oder V<sub>H</sub>H's sind möglich. Spezifische Antikörperfragmente können durch Klonieren von V<sub>H</sub>- und V<sub>K</sub>-Genen aus vorhandenen Hybridomen, die monoklonale Antikörper herstellen, erzeugt werden. Die zweite Möglichkeit, rekombinante Antikörperfragmente zu gewinnen, stellt die Phage Display-Technologie dar. Der Erfolg von Immunmodulationsexperimenten hängt von der Spezifität der rekombinanten Antikörper, sowie von einer richtig gefalteten Struktur der Antikörper ab, die auch unter reduzierenden Bedingungen stabil sein muss. Im Fall einer kompetitiven Inhibierung spielt eine hohe Affinitätskonstante eine große Rolle, um erfolgreich mit Substrat und Liganden zu konkurrieren. Der Antikörper sollte außerdem an ein Epitop nahe der Proteindomäne binden. (Gahrtz und Conrad, 2009; Conrad und Manteuffel, 2001)

Die erste publizierte Immunmodulation war ein in Tabak exprimiertes scFv gegen Phytochrom. Solche transgenen Pflanzen zeigten eine anormale lichtabhängige Keimung in homozygoten transgenen Samen (Owen *et al.*, 1992). Jobling *et al.* gelang es ein

cameloides V<sub>H</sub>H in Kartoffelchloroplasten herzustellen, welches die Funktion von stärke-spaltenden Enzymen inhibiert (Jobling *et al.*, 2003). Ein weiteres erfolgreiches Experiment war die Entwicklung von scFv's gegen sHSP's (kleine cytosolische Hitzeschockproteine). Durch diese scFv's wurde die Funktion individueller Stressoligomere und die Funktion von HSG's (Hitze-Stress-Granula) während der Stressantwort aufgeklärt. (Miroshnichenko *et al.*, 2005). Die erste Immunomodulation von Phytohormonen wurde bei Abscisinsäure (ABA) gezeigt, wodurch deren Einfluss auf die Stomata und Samenentwicklung bekannt wurde (Artsaenko *et al.*, 1995).

## 1.2 Die Rolle von *N. benthamiana* in der Pflanzenbiotechnologie

*Nicotiana benthamiana* ist eine Pflanzenart der Gattung Tabak (*Nicotiana*) aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*). Es handelt sich um die am häufigsten genutzte Experimentalpflanze in der Pflanzenvirologie. Eine große Bandbreite diverser Pflanzenviren kann *N. benthamiana* infizieren, weshalb diese Tabakpflanze lange Zeit nur auf dem Gebiet der Virologie von großer Bedeutung war (Goodin *et al.*, 2008). Drei neue technische Vorstöße zur Proteinmanipulation und Genexpression in Pflanzenzellen sorgten jedoch für eine Erweiterung der Anwendung, da sich *N. benthamiana* am besten dafür eignet. Zuerst wurde die Möglichkeit entdeckt, fremde Gene eines pflanzlichen viralen Vektors zu exprimieren - eine Technik, die neue Einblicke in fundamentale Aspekte der Pflanzenbiologie brachte (Chapman *et al.*, 1992). Als nächstes führte die Anwendung Pflanzen-basierter viraler Vektoren zur Entwicklung von VIGs (virus-induced gene silencing), einer Technik, die direkt eine systemische Downregulation eines einzelnen Gens in Pflanzen ermöglicht (Kumagai *et al.* 1995). Einer der größten Vorteile von VIGS besteht in der Möglichkeit, die genetische Redundanz zu verringern. Die letzte Technologie, die *N. benthamiana* als Forschungsobjekt berühmt gemacht hat, ist die Agroinfiltration (Goodin *et al.* 2002). Dabei wird das pflanzliche Gewebe mit rekombinanten *A. tumefaciens*, ein für Pflanzen pathogenes Bodenbakterium, das die Fähigkeit besitzt, Teile der eigenen DNA in Pflanzen zu übertragen, infiziert. Darüber hinaus wird DNA aus *A. tumefaciens* vorübergehend in Pflanzenzellen exprimiert, ohne in das Pflanzengenom integriert zu werden. Die Expression erfolgt nur vorübergehend für einige Tage. Der Vorteil dieser transienten Systeme besteht darin, dass das Zielprotein in sehr kurzer Zeit produziert werden kann. Schon nach 24-48 h Inkubationszeit können Teile



infiltrierter Blätter geerntet und verarbeitet werden (Goodin et al. 2008). Der optimale Expressionszeitpunkt muss für jedes Konstrukt einzeln bestimmt werden.

### **1.3 Abscisinsäure (ABA) und ABA-Rezeptoren**

In vielen Regionen leiden Pflanzen infolge des Klimawandels unter veränderten Umweltbedingungen, so dass weltweit daran gearbeitet wird, Nutzpflanzen anzupassen um deren Ertrag zu sichern oder zu steigern. Besonders Trockenheit ist einer der abiotischen Hauptstressfaktoren der auf Pflanzen einwirkt. Über 50% der Erdoberfläche, davon ein hoher Anteil an Ackerland, ist durch Trockenheit gefährdet (Kogan, 1997). Gefäßpflanzen verfügen über die Fähigkeit Phytohormone, eine Gruppe von Sekundärstoffen mit funktioneller Wirkung zu produzieren, um in bestimmten Zellen Wachstums-, Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse zu regulieren. ABA ist solch ein ubiquitäres Phytohormon, das aus einer Xanthophyll- Zwischenstufe heraus, hauptsächlich in Blättern der Pflanzen biosynthetisiert wird, von wo aus der Transport über das Phloem bis zu den Wurzeln erfolgt (Schopfer, 2010). Von da aus dient ABA als zentraler Regulator bei der Reaktion auf verschiedene stresserzeugende Umweltfaktoren, wie extreme Temperaturen, Trockenheit oder eine erhöhte Salzkonzentration des Bodens (Verslues *et al.*, 2006) und koordiniert ein komplexes Netzwerk, das Pflanzen ermöglicht mit Wassermangel zu leben (Cutler *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010). Bei abiotischen Stressbedingungen stimuliert es das Schließen der Spaltöffnungen und verursacht eine veränderte Genexpression oder die Akkumulation von osmo-kompatiblen Lösungen. Andererseits spielt ABA eine zentrale Rolle in zahlreichen Entwicklungsstadien der Pflanze. Als Antagonist der Giberelline, die das Wachstum und die Reifung von Samen und Früchten fördern, dient ABA als natürlicher Wachstumshemmer und verhindert somit die Keimung. Dies induziert die Bildung von Speicherproteinen, was den Samen Schutz und Energie liefert. Bei der Knospung wird ein weiteres Wachstum von Trieben gehemmt, was jungen Knospen ebenfalls Schutz bietet. (Finkelstein *et al.*, 2008). Die ABA vermittelte Signaltransduktion bei der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress war lange Zeit unverstanden, da im Signalweg der ABA-Rezeptor nicht bekannt war. Jedoch ist es 2009 Wissenschaftlern der TU München zeitgleich mit kalifornischen Kollegen gelungen, unabhängig voneinander die löslichen ABA-Rezeptoren „regulatory component of ABA receptors“ (RCAR) und „pyrabactin resistance 1“ (PYR) bzw. „PYR1-like proteins“ (PYL) zu identifizieren (Ma *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009). Insgesamt wurden 14 Mitglieder der sogenannten

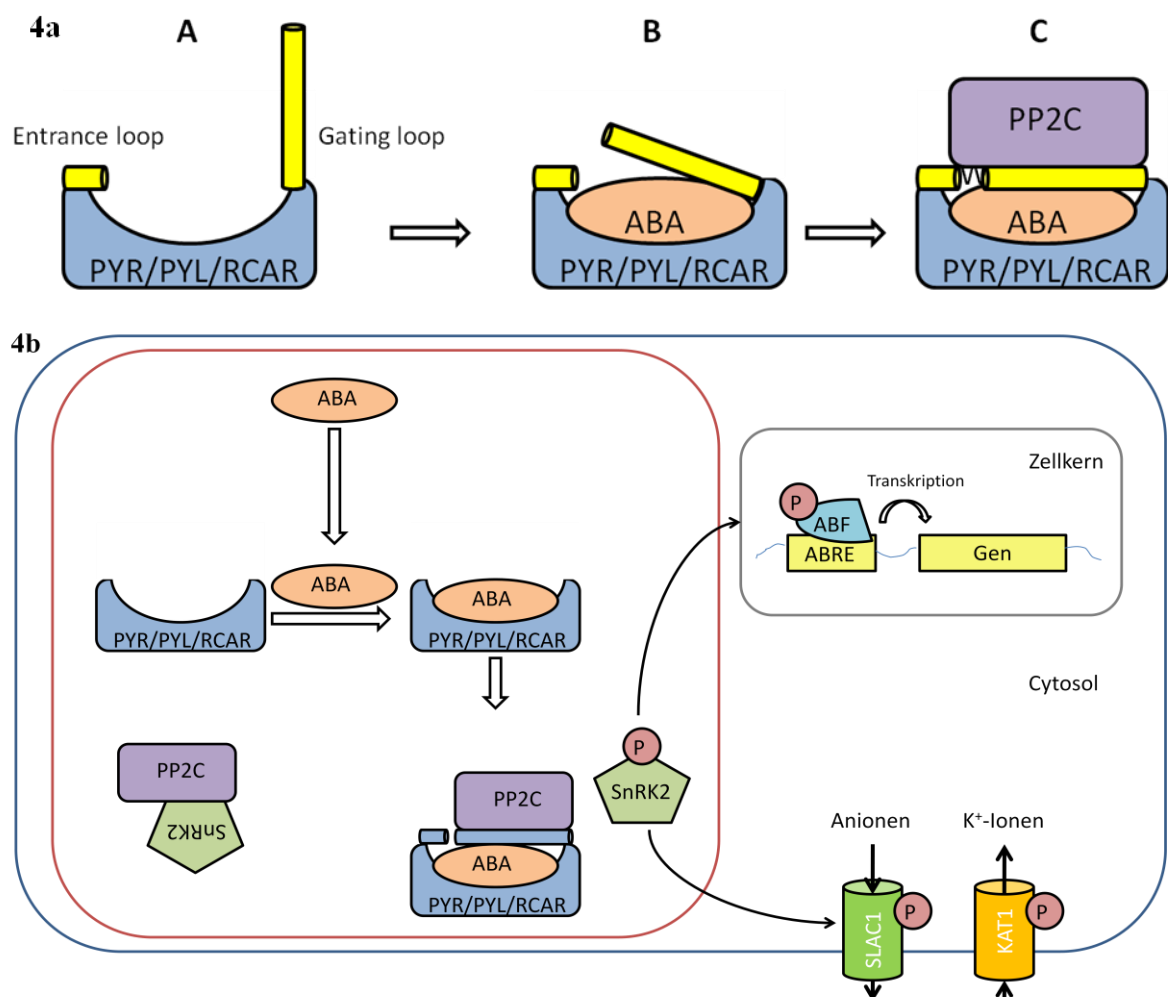
PYR/PYL/RCAR-Familie identifiziert. Diese Rezeptoren sind ähnlich strukturierte ABA-Bindungsproteine aus *Arabidopsis thaliana*, für welche neun Phosphatasen als Bindungspartner infrage kommen. Die Rezeptoren weisen besonders im zentralen Teil eine hohe Sequenzhomologie auf, die auf deren funktionelle Redundanz hinweist. Diese ist jedoch noch nicht vollständig bewiesen. Die Genexpression dieser ABA-Rezeptoren findet vermehrt im Samen und den Schließzellen der Stomata statt. Die Rezeptoren sind sowohl im Cytosol als auch im Zellkern zu finden. Mit der Entdeckung der ABA-Rezeptoren ist die Voraussetzung geschaffen, den ABA-Signalweg vollständig aufzuklären. Das erhöht die Chancen, Nutzpflanzen so aufzurüsten, dass schwierige Umweltbedingungen toleriert werden.

Derzeit ist bekannt, dass Pflanzen den endogenen Botenstoff ABA auch unter normalen Bedingungen ständig in geringen Mengen bilden. Über das Phloem und Xylem wird ABA in der Pflanze verteilt. In Stresssituationen steigt die Produktion von ABA jedoch um das bis zu 40-fache des normalen Niveaus an (Verslues *et al.*, 2006), sodass es durch Rezeptormoleküle (PYR/PYL/RCAR-Proteine) gebunden wird. Die ABA-gebundenen Rezeptoren bilden mit Phosphatasen des Typs 2C (PP2C) Komplexe. Normalerweise blockieren PP2Cs in Abwesenheit von ABA SnRK2-Kinasen, indem sie eine Phosphatgruppe der Kinase entfernen. In Verbindung mit dem ABA-gebundenen Rezeptor verliert die Phosphatase jedoch den Kinase-hemmenden Effekt, sodass die nun aktiven Kinasen die Phosphorylierung von Zielproteinen verursachen (siehe Abb. 4b).

Der Liganden-Bindemechanismus von ABA an den Rezeptor wird durch das Öffnen und Schließen einer Schranke reguliert (siehe Abb. 4a). In Abwesenheit von ABA zeigen PYR/PYL und RCAR-Proteine einen offenen Hohlraum, der durch zwei flexible Oberflächenloops, der „entrance loop“ und der „gating loop“, sowie von weiteren strukturellen Elementen flankiert wird. Ist der Hohlraum von ABA besetzt, schließt sich das „gating loop“ wie eine Schranke, sodass die hydrophobe Seite dieser Schranke aufgedeckt wird. Die Bindung der PP2C Phosphatase an den ABA-gebundenen-Rezeptor erfolgt durch die Anlagerung der Phosphatase an die hydrophobe Seite der „gating loop“. Dabei werden die beiden Loops der PYR/PYL und RCAR-Proteine mit einem Tryptophanrest der Phosphatase verschlossen. Das „gating loop“ interagiert mit der aktiven Seite der Phosphatase und blockiert damit deren Bindungs- und Substratdephosphorylierungsfähigkeit (siehe Abb. 4a). (Sheard *et al.*, 2009, Melcher *et al.*, 2009) Der molekulare Mechanismus der ABA-Signalaufnahme ist bei allen PYR/PYL und

RCAR-Proteinen gleich, da die Sequenzen des „entrance- and gating loops“ bei den gesamten Mitgliedern der Rezeptorfamilie konserviert sind.

Bisher wurden verschiedene Proteinziele der SnRK2-Kinase identifiziert, so z.B. der Transkriptionsfaktor ABF. Dieser wird phosphoryliert, wodurch wiederum eine Transkription von ABA-abhängigen Promotor-Elementen (ABREs) initiiert wird. Durch die ABREs ist die Expression der ABA-regulierten Gene möglich, sodass es zur Bildung spezifischer Botenstoffe kommt (siehe Abb. 4b). (Sheard *et al.*, 2009, Fujii *et al.*, 2009, Umezawa *et al.*, 2009).



**Abbildung 4: 4a: Struktureller Mechanismus der ABA-Wirkung. 4b: ABA vermittelte Signaltransduktion.**

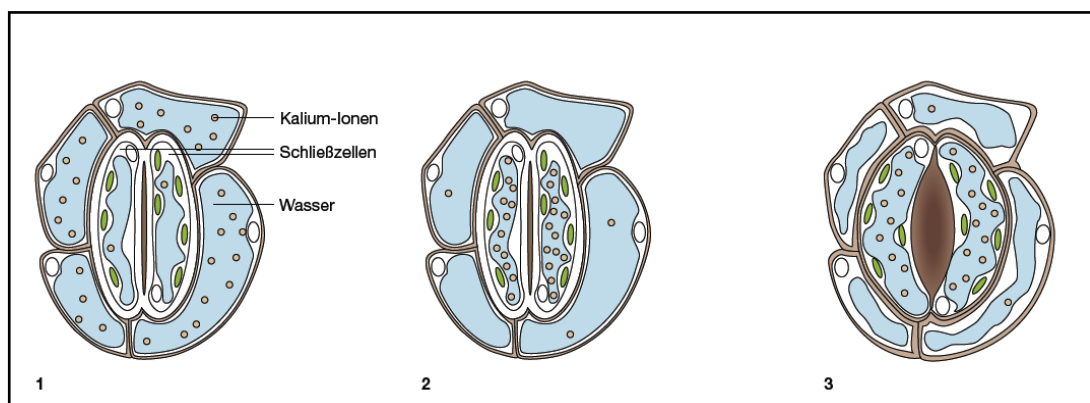
#### 4a: Struktureller Mechanismus der ABA-Wirkung.

**A.** Ligandenfreie Form des Rezeptors. PYR/PYL/RCAR-Proteine präsentieren einen Hohlraum; die Schranke („gating loop“) ist geöffnet. **B.** ABA fügt sich in den Hohlraum des Rezeptors und verursacht das Schließen der „Gating loop“. **C.** Die Phosphatase PP2C bindet mit ihrer aktiven Seite an das „gating loop“ und fügt Tryptophan (W) zwischen „gating und entrance loop“ ein um den Hohlraum endgültig zu verschließen.

#### 4b: ABA vermittelte Signaltransduktion.

In Abwesenheit von ABA liegt die PP2C Phosphatase frei vor und inhibiert die Autophosphorylierung der Familie der SnRK Kinasen. ABA, gebunden an PYR/PYL/RCAR-Proteine, verursacht eine Bindung von PP2C an den ABA-Rezeptor-Komplex. Das hebt die Inhibierung von SnRK2 auf, welche autoaktiviert wird und Transkriptionsfaktoren ABF phosphoryliert und damit aktiviert. ABFs initiieren die Transkription der ABA-reagierenden Promotor Elemente (ABREs). Diese starten die ABA abhängige Genexpression. SnRK-2-Kinasen kontrollieren außerdem membranständige Ionenkanäle

Die aktivierten SnRK2-Kinasen kontrollieren außerdem Ionenkanäle in der Plasmamembran der Schließzellen (siehe Abb. 4b), wodurch das Schließen der Spaltöffnungen gesteuert wird (siehe Abb. 5). Zunächst werden die Transportkanäle in den Schließzellen der Stomata geöffnet. Es kommt zu einer Depolarisation, die die Entstehung eines positiven Membranpotentials zur Folge hat, sodass Kaliumkanäle geöffnet werden. Durch den Kaliumfluss aus den Apoplasten strömt durch den osmotischen Druck Wasser als passive Reaktion mit, was zum Schrumpfen der Schließzellen und damit zum Verschluss des Spalts führt (Umezawa *et al.*, 2010, Sheard *et al.*, 2009).



**Abbildung 5: Schließzellen mit umliegenden Epidermiszellen. (Quelle: [www.botanik.wzw.tum.de](http://www.botanik.wzw.tum.de))**

1. Die Spaltbildung erfolgt, indem Kalium-Ionen in die Schließzellen transportiert werden, Wasser nachströmt und die Schließzellen gedehnt werden. Bei Wassermangel verursacht ABA einen Kalium-Ausstrom, der den osmotischen Druck verringert und die Schließzellen erschlaffen lässt 2. Schließzellen in geschlossenen/sich öffnenden Zustand 3. Schließzellen in geöffneten/sich schließenden Zustand

Eine mögliche Beeinflussung der ABA-Signaltransduktion kann dazu beitragen, für die Landwirtschaft zukünftig wichtige Themen wie Trockenresistenz und Salzstress zu bearbeiten.

Der ABA-Rezeptor RCAR1 hat einen Umfang von 187 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 23,3 kDa. RCAR11 umfasst 191 Aminosäuren. Diese beiden Antigene wurden durch Simone Demmel, AG Prof Dr. Erwin Grill, TU München, Biologikum Weihenstephan bereitgestellt. Das B-Fragment von RCAR1 erstreckt sich von Aminosäure 77-128 und wurde im Rahmen einer Praktikumsarbeit (Castaldello, 2010) hergestellt und gereinigt.

Sequenz RCAR1 (gelb: RCAR1-B):

MDGVEGGTAMYGGLETVQYVRTHHQHLCRENQCTSALVKHIKAPLHLVWSLVR  
RFDQPQKYKPFVSRCTVIGDPEI **GSLREVN VKSGLPATTSTERLELLDDEEHILGIKII**  
**GGDHRLKNYSSILTVH**PEIIEGRAGTMVIESFVVDVPQGNTKDETCYFVEALIRCNL  
KSLADVSERLASQDITQ

Sequenz RCAR11:

MPSELTPEERSELKNSIAEFHTYQLDPGSCSSLHAQRIHAPPELVWSSIVRRFDKPQ  
TYKHFIKSCSVEQNFEMRVGCTRDVIVISGLPANTSTERLDILDDERRVTGFSIIGGE  
HRLTNYKSVTTVHRFEFKENRIWTVVLESYVVDMPGNSSEDDTRMFADTVVKLN  
LQKLATVAEAMARNSGDGSGSQVT

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Bachelorarbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Abscisinsäure vermittelten Signaltransduktion leisten. Die Entdeckung der ABA-Rezeptoren im Jahr 2009 leistete einen Durchbruch bei der Aufklärung des ABA-Signalweges. Offen bleibt jedoch, ob die entdeckten Rezeptoren jeweils für eine spezifische Funktion verantwortlich sind. Auch die Präsenz der verschiedenen RCAR-Proteine in einzelnen Geweben ist eine wichtige Frage. Für all diese Untersuchungen ist die Entwicklung immunologischer Tools von großer Bedeutung. Hierzu wurden in der AG Phytoantikörper rekombinante Antikörper gegen interne Fragmente verschiedener RCAR's entwickelt (Kunze, 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit dimere scFv's, die über die ck-Strategie erzeugt wurden, stabil sind und welche Bindungseigenschaften sie aufweisen. Im Einzelnen wurden folgende experimentelle Arbeiten geplant:

- Erzeugung eines veränderten *anti*-RCAR1-scFv mit verkürzten Linker, um die ck-Strategie erfolgreich anzuwenden,
- Konstruktion eines entsprechenden *anti*-RCAR1-scFv-ck-Expressionsvektors,
- Transiente Expression in *N. benthamiana*,
- Reinigung, physikalische und funktionelle Charakterisierung der neu konstruierten rekombinanten Antikörper.

Auf diese Weise sollen immunologische Werkzeuge zur zellbiologischen Analyse von RCAR-Funktionen entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden nach Anleitung hergestellt, mit dest. Wasser versetzt und ggf. autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min). Alle benötigten Chemikalien und deren Hersteller sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
BIO-RAD-Protein-Assay (Bradford-Reagenz)	BIO-RAD, München, BRD
Acetosyringon, BSA, EDTA, Diethanolamin, Essigsäure, Ethanol, Glukose, Glycerin, Glycin, Imidazol, IPTG, Isopropanol, Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ), Methanol, Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), Natriumhydrogenphosphat (NaHPO <sub>4</sub> ), Sucrose, Tween 20, Tris	Roth, Karlsruhe, BRD
Bromphenolblau	Ferak, Berlin, BRD
Coomassieblue-R250, Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, BRD
Entwickler LX24, Fixierbad AL4	Intas, Göttingen, BRD
Milchpulver	Saliter, Obergünzburg, BRD
pNPP	Sigma, Deisenhoden, BRD
TEMED	Acris Feinchemikalien GmbH, Heidelberg, BRD
Trypton, Hefeextrakt, Agar	Difco, Lawrence, USA

#### 2.1.2 Medien und Puffer

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Medien zur Anzucht von Bakterien und Infiltration von Pflanzen sowie die eingesetzten Puffer sind nachfolgend aufgeführt.

##### 2.1.2.1 Medien

Die verwendeten Medien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Übersicht über verwendete Medien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>		
Infiltrationsmedium	0,36 %		Glukose
	0,86 %		MS-Medium + Vitamin
	10 %		MES
LB-Agar	1%		NaCl
	1%		Trypton
	0,5%		Hefeextrakt
	2%		Agar
LB-Medium	1%		NaCl
	1%		Trypton
	0,5%		Hefeextrakt
SOC-Medium	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	MgSo <sub>4</sub>
	2,5	mM	KCl
	10	mM	NaCl
	2%		Trypton
	0,5%		Hefeextrakt
	20	mM	Glukose
YEB-Medium	0,5%		Rinderextrakt
	0,1%		Hefeextrakt
	0,5%		Pepton
	0,5%		Sucrose

### 2.1.2.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für SDS-Page, Coomassie-Färbung und Western Blot, die Agarose-Gelelektrophorese, indirekte und kompetitive ELISA-Experimente (Enzyme-linked Immunosorbent Assay-Experimente), Minipräparationen und die Proteinreinigung sind in Tabelle 3 bis 7 aufgelistet.

**Tabelle 3: Puffer und Lösungen für SDS Page, Coomassie-Färbung und Western Blot**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>		
10x SDS-Elektrophoresepuffer	5	mM	Tris
	0,1%		SDS
	192	mM	Glycin
SDS-Probenpuffer	72	mM	Tris
	10%		Glycerin
	3%		SDS
	5%		β-Mercaptoethanol
	0,25	μM	Bromphenolblau
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5	M	Tris
	14	mM	SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5	M	Tris
	14	mM	SDS
Laufpuffer	25	mM	Tris

	250 mM Glycin 0,1% SDS
Coomassie-Brillant-Blau-Lösung Färbelösung	45% Methanol 0,05% Coomassieblue R250 10% Essigsäure
Entfärbelösung	25% Ethanol 8% Essigsäure
Transferpuffer	20% Methanol 0,5 mM Tris-Hcl 0,01% SDS 19,2 mM Glycin
Marvelpuffer (pH 7,8)	20 mM Tris (pH 6,8) 180 mM NaCl

**Tabelle 4: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBE-Puffer	0,089 M Tris-Borat 0,089 M Borsäure 0,002 M EDTA
Gel-Loading Puffer	0,125% Bromphenolblau 125 mM EDTA 50% Glycerin

**Tabelle 5: Puffer und Lösungen für den ELISA.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	150 mM NaCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phagen-PBS (pH7,2)	100 mM NaCl 32 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
Substratpuffer für pNPP	9,7% Diethanolamin 0,01% MgCl <sub>2</sub> 0,02% NaN <sub>3</sub>

**Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Minipräparation.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat
Lösungspuffer	20 mM NaOH 1% SDS

**Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer (pH 7,9)	10 mM Imidazol



	500 mM NaCl
	20 mM Tris
Bindepuffer (pH 7,9)	20 mM Imidazol
	500 mM NaCl
	20 mM Tris
Elutionspuffer	250 mM Imidazol
	500 mM NaCl

### 2.1.3 Standards und Kits

Alle verwendeten Standardlösungen und Kits sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Standards und Kits

Bezeichnung	Hersteller
<b>Kits</b>	
Quiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, BRD
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Plasmid-Mini Kit	Qiagen, Hilden, BRD
ECL Kit	GE Healthcare, Amersham, UK
<b>Standards</b>	
Seebblue Plus2 Pre-stained Range Protein	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD

### 2.1.4 Antibiotika

In der praktischen Arbeit eingesetzte Antibiotika sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Appligene, Heidelberg (BRD)
Kanamycin	Duchefa, Haarlem (Niederlande)
Carbenicillin	Duchefa, Haarlem (Niederlande)
Rifampicin	Duchefa, Haarlem (Niederlande)

### 2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 10 zeigt die verwendeten Bakterienstämme mit dem jeweiligen Genotyp.

Tabelle 10: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E.coli</i> XL1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,

	supE44, relA1, lac [F'proAB lac1 qZ DM15 Tn10 (Tetr)]
<i>A. Tumefaciens</i> pGV 2260	C58C1, Rif <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup>

### 2.1.6 Plasmide

Tabelle 11 listet die verwendeten Vektoren und deren Resistenz.

Tabelle 11: Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Spezifizierung	Hersteller
pIT	Ampicillin	Phagemid	AG Phytoantikörper
pRTRA 7/3	Ampicillin	Pflanzlicher Expressionsvektor	AG Phytoantikörper
pCB 301	Kanamycin	Shuttle Vektor	AG Phytoantikörper

### 2.1.7 Antikörper und Antigene

Eingesetzte Antikörper und Antigene sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Antikörper und Antigene

Bezeichnung	Hersteller
anti-c-myc (anti-c-myc-Antikörper)	Ag Phytoantikörper IPK Gatersleben (9E10, Hybridomüberstand)
Anti-mouse-IgG-Alkaline-Phosphatase-Conjugate (mit alkalischer Phosphatase konjugierter Maus-IgG bindender Sekundär-Antikörper aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-mouse-IgG-Peroxidase-Conjugate (mit Peroxidase konjugierter Maus-IgG bindender Sekundär-Antikörper aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 2.1.8 Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme und dafür verwendete Puffer

Die in der Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme und die dazugehörigen Puffer sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Restriktions- und Ligationsenzyme

Bezeichnung	Hersteller
-------------	------------

<i>Bam</i> HI (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
<i>Xho</i> I (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
<i>Not</i> I (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
<i>Hind</i> III (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
<i>Nco</i> I (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
10 x Restriktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
Ligase (FastDigest)	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
10 x Ligasepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD

## 2.1.9 Geräte

Tabelle 14 listet alle während der Arbeit benötigten Gerätschaften auf.

**Tabelle 14: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Varioclav	H+P Labortechnik AG (BRD)
Blottingapparatur	BioRad Mini-PROTEAN II Blotting Cell	Bio-Rad Laboratories (USA)
Elektrophoreseapparatur	BioRad Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories (USA)
Elektrotransformationsgerät	Gene Pulser	BIO-RAD, München (BRD)
ELISA-Lesegerät	Tecan Infinite® M200	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, BRD)
ELISA-Inkubator	Heidolph Inkubator 1000	Heidolph Elektro GmbH & Co.KG (Kelheim, BRD)
ELISA-Waschgerät	Hydro Flex	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, BRD)
Exsikkator	Vakuumexsikkator	Schott, Mainz (BRD)
Gasbrenner	Flammy S	Schütt Labortechnik (BRD)
Inkubationsschrank	Heraceus	Thermo Scientific, Karlsruhe, BRD
Laminarbox	LamnAir® HB 2448	Heraeus Instruments (BRD)
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	Schütt Labortechnik (BRD)
Nanodrop	Spectrophotometer ND-1000	peQ Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen (BRD)
pH-Elektrode	Inolab	WTW GmbH, Weilheim (BRD)
Photometer	Spectronic GENESYS Bio	Thermo Scientific (BRD)
Photometer	Novaspec II	Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden
Retschmühle	Retsch MM400	Retsch GmbH, Haan (BRD)
Rührgerät	Ikamag Ret	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen (BRD)
Schüttelbrutschrank	Multitron	INFORS (Schweiz)

SDS-Page-Kammer		BIO-RAD, Münschen (BRD)
Spannungsquelle		Consort, Turnhout (Belgien)
Thermomixer	5436/Compact	Eppendorf AG, Hamburg (BRD)
Vakuumpumpe	Membranvakuumpumpe	Vaccubrandt GmbH+Co (Wertheim)
Vortexer	MS 2 Minishaker	IKA (BRD)
Waage	Portable PT 1200	Sartorius, Göttingen (BRD)
Waage	KERN470	Sartorius, Göttingen (BRD)
Waage	pT1200	Sartorius, Göttingen (BRD)
Zentrifuge	Sorvall RC-5B Refridgerated Superspeed Centrifuge	De Pont Instruments (USA)
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Heraeus (BRD)
Zentrifuge	Mikro 22R Hettich Zentrifugen	Schütt Labortechnik (BRD)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 PCR

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wird eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction-PCR) durchgeführt.

Für eine PCR wird ein Reaktionsansatz benötigt, der die Template-DNA (das zu vervielfältigende DNA-Fragment), die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), eine DNA-Polymerase, Primer (gegenläufig orientierte Oligonukleotide, welche die Template-DNA flankieren) und einen entsprechenden Puffer enthält.

Im ersten Schritt des PCR-Zyklus, der Denaturierung, wird der DNA-Doppelstrang durch hohe Temperaturen (94°C) in 2 Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich Primer an die entsprechenden DNA Abschnitte der beiden Einzelstränge bei einer Temperatur zwischen 40 und 60 °C an. Während der darauf folgenden Elongation sorgt die Polymerase für die Synthese neuer DNA-Stränge. Dieser Schritt findet bei 72 °C statt, der Temperatur, bei der die Polymerase ihre optimale Aktivität besitzt. Nach solch einem Zyklus ist eine Verdopplung der DNA erreicht. Wird der Zyklus mehrfach durchgeführt, in der Regel 40 mal, vervielfältigen sich die DNA Stränge im exponentiellen Wachstum. Nachdem alle Zyklen durchlaufen wurden, folgt ein

finaler Elongationsschritt, um sicher zu stellen, dass die DNA-Synthese vollständig abgeschlossen ist (Mühlhardt 2000). Danach wird die Temperatur auf 4 °C abgesenkt. Die PCR-Schritte laufen automatisch in einem Thermocycler ab.

Zur Herstellung von dimeren *anti*-RCAR1-scFv's sollte der Linker zwischen der leichten und schweren Kette verkürzt werden. Die PCR dient hierbei als methodisches Werkzeug um gezielt eine Mutation (genauer eine Deletion) im DNA-Strang *in vitro* einzuführen (Lottspeich, 2006). Für die Deletion eines Teils der Linkersequenz wurde zunächst die leichte und die schwere Kette des anti-RCAR-scFv's mit einem Teil der GSS-Linkersequenz in zwei voneinander getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert. Dabei schlossen die inneren Primer die zu deletierende Region aus. Am 5'-Ende befand sich bei beiden PCR-Produkten eine zur anderen Seite komplementäre Region. Die leichte und schwere Kette des scFv's wurden durch eine Fusions-PCR, oder auch SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension-PCR) wieder zusammengesetzt. Dafür wurden die beiden Template-Stränge miteinander gemischt und mit den beiden äußeren Primern erneut amplifiziert. Nach der Denaturierung können sich zwei PCR-Produkte an ihren komplementären Enden aneinanderlagern und so verlängert werden.

#### **2.2.1.2 Hydrolytische Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Im Verlauf einer Klonierung ist die Restriktionsspaltung der Enden eines DNA-Konstrukts von Bedeutung. Durch diese Spaltung wird eine Klonierung erst ermöglicht. Für diese Präparation, die anschließend in der Ligation verwendet werden konnte, wurde ein Restriktionsansatz von 20 µl gewählt:

3 µl DNA-Konstrukt  
4 µl 10x Restriktionspuffer für FastDigest Restriktionsendonukleasen  
1,5 µl DNA Restriktionsendonuklease *Bam*H1 (FastDigest)  
1,5 µl DNA Restriktionsendonuklease *Xho*1 (FastDigest)  
10 µl dest. Wasser

Der Restriktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und stand dann für eine Reinigung (vgl. Kap. 2.2.1.3) und die sich anschließende Ligation (vgl. Kap. 2.2.1.4) bereit.

### 2.2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA

Die Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *PCR Purification Kits* (Qiaquick) (www.qiagen.com) der Firma Qiagen, Hilden. Zuerst wurde das Fünffache des Volumens der Plasmid-DNA von Puffer PBI zum PCR-Mix dazugegeben. Die Lösung wurde solange homogenisiert, bis sie die gleiche Färbung hatte, wie der PBI-Puffer zu Beginn und im Anschluss auf eine Säule (Qiaquick column, Qiagen, Hilden) gegeben. Diese Säule wurde für 60 s zentrifugiert (13000 rpm, Raumtemperatur), um die DNA zu binden. Der Durchlauf wurde verworfen und die gebundene DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Erneut wurde der Durchlauf verworfen und die leere Säule konnte zentrifugiert werden, um den restlichen Alkohol zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule in ein neues Tube gestellt und die gereinigte DNA mit 30 µl dest. Wasser eluiert, wobei die Säule mit dem dest. Wasser auf der Membran erst 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 1 min, bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert wurde.

### 2.2.1.4 Ligation

Eine Ligation wird durch die Verwendung spezieller Enzyme, den Ligasen, erreicht, die DNA-Fragmente verknüpfen. Durch die T4-DNA-Ligase, eine Phosphordiester-Ligase und einem entsprechenden Puffer (beides Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurden die freie 5'-Phosphatgruppe und die freie 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose fest miteinander verbunden. Die einzusetzende Fragmentmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert (ng)} = \frac{5 \cdot \text{Vektormasse (ng)} \cdot \text{Insertlänge (bp)}}{\text{Vektorlänge}} \quad (\text{Mühlhardt, 1999}).$$

Der Ligationsansatz von 20 µl umfasste:

- 2 µl 10x Ligasepuffer
- 2 µl Ligase
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- x ng DNA-Fragment (siehe Formel).

Der Ansatz wurde entsprechend auf 20 µl mit dest. Wasser aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente Zellen

transformiert (vgl. Kap. 2.2.2.1) und auf einen entsprechend selektiven Nährboden ausplattiert.

#### **2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten wurde eine elektrophoretische Auftrennung im 1%-igen Agarosegel (1% Agarose in 1 x TBE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) durchgeführt. Die farblosen Proben, die ohne Fast Digest Green Buffer angesetzt waren, wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt. Als Marker zur Größenbestimmung diente *Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Das Agarosegel wurde für 1 h an ein elektrisches Feld (80V) angeschlossen, sodass die negativ geladene DNA durch das Gel zum Pluspol wandern konnte. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar und für eine Präparation mittels Skalpell herausgeschnitten, welches eine anschließende Extraktion ermöglicht (vgl. Kap. 2.2.1.6).

#### **2.2.1.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Die Extraktion eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel erfolgte mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) von Qiagen (Hilden). Pro mg Gel wurde das dreifache Volumen an QG-Puffer hinzupipettiert und für 10 min bei 50°C inkubiert, bis sich das Gel komplett aufgelöst hatte. Dann wurde Isopropanol im gleichen Volumen wie das Ausgangsgewicht des Gels zugegeben. Um die DNA zu binden wurde auf eine Qiaquick-Säule (Qiaquick column, Qiagen, Hilden) in 750 µl-Schritten das aufgelöste Agarosestück im QG-Puffer und Isopropanol pipettiert und jeweils für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Reinigen der Säule von Agaroserückständen, erfolgt ein Reinigungsschritt, bei dem 500 µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert wurden, die im Anschluss wiederum für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert werden musste. Durch Zugabe von 0,75 ml PE-Puffer und einer erneuten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde die Säule gewaschen. Um alle Reste endgültig zu entfernen, folgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt der leeren Säule bei 13000 rpm. Die Elution erfolgte mit 30 µl destilliertem Wasser und anschließender Zentrifugation.

Die extrahierte DNA kann für Restriktionsspaltungen (vgl. Kap. 2.2.1.2) oder Ligationen (vgl. Kap. 2.2.1.4) eingesetzt werden.

### **2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)**

Die Minipräparation wurde nach dem *Plasmid Mini Purification Protocol*, unter Verwendung der Puffer des Mini- bzw. Midi-Kits ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) von Qiagen (Hilden), durchgeführt. Sie dient der Präparation der *anti-RCAR1*-Konstrukte in verschiedenen Vektoren aus *E.coli* XL1 blue Zellen (Birnboim & Doly, 1979). Die Kolonien wurden in 3 ml selektivem LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Durch eine Zentrifugation (13000 rpm, 3 min) wurden die Bakterien abgeerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Puffer P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch fünfminütige Inkubation mit 200 µl Puffer 2 (200 nM Natriumhydroxid, 1% SDS). 300 µl Puffer 3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) führen bei zehnminütiger Inkubation auf Eis zur Fällung der Suspension. Um die Plasmid-DNA von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Lösung 10 min bei Raumtemperatur und 12000 rpm zentrifugiert und 500 µl des sauberen Überstands in ein neues Tube überführt. Das Pellet wurde verworfen. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 250 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sich im Pellet befindliche Plasmid-DNA wurde mit 400 µl 70 %-igen Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA konnte anschließend in 30 µl dest. Wasser resuspendiert werden.

## **2.2.2 Produktion rekombinanter Proteine**

### **2.2.2.1 Transformation mittels Elektroporation**

Die Transformation ist neben der Transduktion und der Konjugation eine Form der Parasexualität. Voraussetzung für die Transformierbarkeit von Zellen ist die Kompetenz von Bakterien. Die fremde, frei in der Umgebung vorliegende DNA wird in die DNA des Bakteriums eingebaut und bei Zellteilungen weitergegeben. Bei der freien DNA handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um die entsprechenden Expressionsvektoren mit den *anti-RCAR1*-Genkonstrukten. Mit dem jeweiligen Genkonstrukt werden auch verschiedene Resistenzen vermittelt, so dass erfolgreich transformierte Zellen auf einem entsprechenden Selektionsmedium vermehrt werden können. Es gibt die Möglichkeit die Transformation mittels Hitzeschock oder Elektroporation durchzuführen. Im Rahmen der Arbeit wurde sich für die Elektroporation entschieden, da diese Methode eine höhere Transformationseffizienz liefert.



Die für die Transformation erforderlichen kompetenten Zellen der Stämme *E.coli* XL1 blue bzw. *A.tumefaciens* GV 2260 wurden gebrauchsfertig von der AG Phytoantikörper des IPK Gatersleben zur Verfügung gestellt.

Vor der Elektroporation muss eine Entfernung der Salze mittels Mikrodialyse gegen destilliertes Wasser durchgeführt werden. Dabei wird der Ligationsansatz auf Nitrozellulose (0,025 µm) gegeben, wobei die Salze durch die semipermeable Zellulosemembran in das umgebende Wasser gelangen. Nach einer Stunde wurden elektrokompente Zellen mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt. Die Lösung wurde in eine gekühlte Elektroporationskuvette übertragen und bei 2,5 kV am Gene Pulser elektroporiert, wobei die Membran durch kurze elektrische Stöße permeabilisiert wird, was die Aufnahme der DNA ermöglicht. Die Zellregeneration erfolgte für 1 h bei 37 °C in SOC-Medium. Für die Selektion der *E.coli* XL1 blue-Zellen wurden Platten mit LB-Medium und Kanamycin bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die *A.tumefaciens*-Zellen wurden für die Selektion auf YEB-Medium mit Kanamycin (Km), Carbenicillin (Carb) und Rifampicin (Rif) ausgestrichen und zwei Tage bei 28 °C kultiviert. Erfolgreich transformierte Zellen wurden entweder zur erneuten Minipräparation (vgl. Kap. 2.2.1.7) verwendet oder für eine transiente Expression in *N. benthamiana* in einer Vorkultur vermehrt (vgl. Kap. 2.2.2.2 und Kap. 2.2.2.3).

#### **2.2.2.2 Transiente Transformation von *N. benthamiana* durch Injektion**

In Vorbereitung der transienten Expression von *anti-RCAR1-scFv-ck* in *N. benthamiana* wurden für die *Agrobacterium*-vermittelte Injektion zunächst jeweils eine Vor- und eine Expressionskultur benötigt. Die Vorkultur dient dem optimalen Wachstum der Expressionskultur. Für die Injektion wurden 10 ml YEB Medium mit 20 µl MgSO<sub>4</sub>, 6 µl Rif, 10 µl Carb und 10 µl Km mit einer entsprechenden Kolonie von der YEB-Agarplatte des zu injizierenden *Agrobacterienstammes* angesetzt und über Nacht bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag mit Acetosyringon (20 µM), Glukose (10 mM) und MES (10 mM) versetzt und bei 28 °C und 180 rpm einen weiteren Tag inkubiert. 2,5 ml dieser Kultur wurden mit 5 ml 2x Infiltrationsmedium und 2,5 ml dest. Wasser versetzt. Die Rückseite eines Blattes von *N. benthamiana* wurde leicht eingeritzt, sodass das Medium an den verwundeten Blattstellen mit Druck injiziert werden konnte und sich im Blattinneren verteilt. Nach vier und fünf Tagen im Gewächshaus bei 23°C und 16 h Licht konnten mit einem Korkbohrer (13 mm Durchmesser) Blattproben genommen und aufgearbeitet werden (vgl. Kap. 2.2.2.5).

### 2.2.2.3 *Transiente Transformation von N. benthamiana durch Infiltration*

Für die Vakuuminfiltration zur transienten Expression in *N. benthamiana* wurde zunächst eine Kolonie in 5 ml YEB-Medium mit 10 µl MgSO<sub>4</sub>, 3 µl Rif, 5 µl Km und 5 µl Carb angeimpft. Außerdem wurde eine Kokultur mit Hc-Pro (engl. *helper component proteinase*) angelegt, die der Expressionssteigerung dient. Hc-Pro ist ein Suppressor für das posttranskriptionale „gene silencing“ (PTGS). PTGS wird durch einen erhöhten Durchsatz transgener RNA in Pflanzen verursacht und benötigt ein RNA abhängiges RNA-Polymerase-ähnliches Protein, dass die Synthese komplementärer RNA katalysiert (Ahmad *et al.*, 2010). Um diesen pflanzlichen Abwehrmechanismus entgegenzuwirken entwickelten Pflanzenviren ein Gegenprotein (Hc-Pro) welches verhindert, dass Transgene ausgeschaltet werden (Graw, 2010). Die gleichzeitige Expression des Zielgens mit Hc-Pro wirkt dem PTGS entgegen und steigert somit die Expressionsrate. Diese beiden Vorkulturen wurden über Nacht bei 28 °C und 160 rpm inkubiert und am nächsten Tag in 500 ml YEB-Medium mit 1 ml MgSO<sub>4</sub> und den jeweiligen Resistenzen (300 µl Rif, 500 µl Km, 500 µl Carb) überführt und eine weitere Nacht unter o.g. Bedingungen gehalten. Die beiden Expressionskulturen wurden am nächsten Tag bei 5000 rpm, 4°C für 15 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml Infiltrationspuffer (1 x MES, 0,01 x MgSO<sub>4</sub>) resuspendiert. Für die eigentliche Infiltration wurden je 180 ml der resuspendierten Hc-Pro und *anti*-RCAR1-Kultur zusammen mit 1840 ml Infiltrationsmedium in ein 2 ml Becherglas gegeben. Das Becherglas wurde in einen Exsikkator gestellt und die gesamte Pflanze kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht. Für 3 min wurde mittels Vakuumpumpe ein starker Unterdruck (1 bar) angelegt, sodass die Suspension mit den Agrobakterien in die Blätter der Pflanze gesaugt wurde. Die Pflanzen wurden vier Tage im Gewächshaus bei 23 °C und 16 h Licht pro Tag inkubiert.

### 2.2.2.4 *Proteinernte und Aufarbeitung*

Die Herstellung und Analyse von Blattproben erfolgte in Anlehnung an Gahrtz & Conrad (2009).

Den mittels Injektion transformierten Blättern wurde nach vier und fünf Tagen je zwei Proben a 2 Blattstücke pro Blatt mit dem Korkbohrer entnommen. Eine Probe wurde bei -80°C weggefroren, der anderen wurde 2 Metallkugeln zugegeben die in der Retschmühle für 2,5 min die Blattproben bei einer Frequenz von 285 1/s zerkleinerten. Im Anschluss wurden die Proben in 100 µl 1 x SDS Probenpuffer mit Mercaptoethanol aufgenommen und für 10 min bei 95°C erhitzt, damit die Proteine denaturiert und entfaltet werden. Nach

einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm konnte die Proteinmenge mit der Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kap. 2.2.3.1) gemessen und die Proben in der SDS-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.3.2) analysiert werden.

Den mittels Vakuuminfiltration transformierten Pflanzen wurden nach vier Tagen alle Blätter abgenommen (542 g), die direkt im Anschluss mit Stickstoff gemörstert und in 50 ml-Tubes abgefüllt und eingefroren (-80 °C) wurden. Aus den gemörsterten Blättern konnte Rohextrakt für eine SDS-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.3.2) oder ELISA-Experimente (vgl. Kap. 2.2.4) gewonnen werden. Dafür wurden 500 mg Probe in 1,5 ml 50 mM Phosphatpuffer gegeben, die Probe abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C) und der Proteinüberstand 1:2 in 1 x SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol bei 95 °C im Thermomixer gekocht. Außerdem wurde Rohextrakt für die Proteinreinigung mit Ni-NTA Agarose (vgl. Kap. 2.2.2.6) aus den gemörsterten Blättern erstellt, indem 100 g der Tabakblätter in 300 ml 50 mM Phosphatpuffer mit 0,05 % Triton gegeben wurden. Die Lösung wurde für 30 min bei 4 °C geschüttelt wurde, worauf ein Zentrifugationsschritt (30 min, 10000 rpm, 4 °C) folgte. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand konnte als Rohextrakt für die Reinigung verwendet werden.

#### **2.2.2.5 Reinigung von Proteinen durch Ni-NTA Agarose**

Die rekombinanten Proteine wurden aus pflanzlichen Extrakten durch Ni-NTA Agarose unter Nutzung des His-tag durch IMAC („Immobilized Metal Affinity Chromatography“) gereinigt. Hierfür wurde das Ni-NTA Reinigungssystem nach Qiagen (Hilden, BRD) verwendet, welches die hohe Affinität der Ni-NTA Agarose zu den 6 Histidinen des His-tags nutzt. Der His-tag ist nur in geringem Maße immunogen und hat kaum eine Auswirkung auf Sekretion, Kompartimentierung und Faltung der Proteine in den Zellen.

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch Zugabe von 6 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) zu 330 ml Pflanzenrohextrakt in 660 ml Bindepuffer. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C unter Rühren inkubiert. Dabei binden die Histidine des His-tags an die Nickel-Ionen in der Agarose. Der Proteinrohextrakt wurde auf eine Säule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben und dort mit 10 ml Bindepuffer (5 mM Imidazol) und anschließend 20 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen. Durch den niedrig konzentrierten Imidazolanteil wurde das Anbinden von Proteinen über einzelne Histidine verhindert und der Reinigungseffekt verstärkt, da der Imidazolring ebenfalls an den Nickelionen binden kann. Der Extrakt wurde durch viermalige Zugabe von 500 ml Elutionpuffer (250 mM Imidazol) eluiert, was

20 1 ml-Portionen ergab. Der hohe Imidazolanteil im Puffer verdrängte die gebundenen Proteine von der Ni-NTA-Agarose.

## **2.2.3 Biochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Ermittlung des Gehalts an löslichen Proteinen in Extrakten wurde der Bradford-Test angewandt (Bradford, 1976). Dabei bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau in saurer Lösung mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe, indem die SO<sub>3</sub>H-Gruppen des Triphenylmethan-Farbstoffs Protonen an basische Aminosäuren, wie Histidin, Lysin und Arginin, abgeben. Der Unterschied im Adsorptionsspektrum von ungebundenen (470 nm) und gebundenen Proteinkomplexen (595 nm) ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Proteinmenge bei 595 nm. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden (AG Phytoantikörper, IPK Gatersleben) kann anhand der Extinktion die Konzentration an löslichen Proteinen bestimmt werden. Für die Adsorptionsmessung wurden 1 µl der Proteinprobe in 799 µl dest. Wasser zusammen mit 200 µl Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, Großbritannien) in eine Küvette gegeben und bei 595 nm die Adsorption gemessen. Als Nullwert diente der jeweilige Elutionspuffer.

### **2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde in einem diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAA-Gel) durchgeführt (Laemmli, 1970). Zur Identifikation des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsmarker (SeeBlue® Plus2 Prestained Standard, Invitrogen, BRD) genutzt. 100µl der rekombinanten Proteine wurden zuerst mit 100 µl 1x SDS Probenpuffer mit Mercaptoethanol für 10 min bei 98°C erhitzt. Durch das Erhitzen der Proteingemische und die Zugabe von SDS werden Proteine denaturiert und entfaltet. SDS lagert sich außerdem an die hydrophoben Regionen der Proteine an, was ihnen einerseits eine ellipsoide Form verleiht und andererseits eine negative Gesamtladung des SDS-Proteinkomplexes bewirkt. Dadurch können die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Der 1x SDS-Probenpuffer enthält neben SDS auch β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau und Glycerin. Durch β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten oder zwischen Proteinen gespalten. Bromphenolblau wandert aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften immer vor der

Proteinfront und zeigt damit den Fortlauf der Elektrophorese an. Glycerin sorgt durch seine hohe Dichte dafür, dass die Proben in die Geltaschen sinken.

Für die physische Charakterisierung wurde 1x SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol verwendet, um die Höhe des Dimeranteils zu veranschaulichen.

Die zu untersuchenden Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Dieses Gelsystem nutzt Sammel- und Trenngel. Das Sammelgel hat einen niedrigeren pH-Wert und ist schwächer konzentriert als das Trenngel. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 15 zu entnehmen.

**Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ein SDS-PAA-Gel.**

<b>Trenngelgel</b>			<b>Sammelgel</b>	
<b>10 % (7,5 ml)</b>	<b>12,5 % (10 ml)</b>			
2,5 ml	4,15 ml	30 % Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30, Roth)	0,39 ml	30 % Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30, Roth)
1,9 ml	2,5 ml	Trenngelpuffer pH 8,8	0,62 ml	Sammelgelpuffer pH 6,8
3,1 ml	3,25 ml	dest. Wasser	1,5 ml	dest. Wasser
56 µl	15 µl	10 % APS	13 µl	10 % APS
11 µl	75 µl	TEMED	5 µl	TEMED

Das Sammelgel dient der Fokussierung der gesamten Probe, wobei die Proteine zwischen den Zonen der Chlorid- und Glycin-Ionen aus dem Probenpuffer des Sammel- und Trenngels wandern. Dadurch wird allen Proteinmolekülen der gleiche Startpunkt ermöglicht, was dazu führt, dass Proteine mit gleichen Migrationsverhalten nach der Trennung in einem 12,5% bzw. 10%-igen Trenngel als klare Banden erscheinen.

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte, blasenfreie Oberfläche und eine Polymerisation unter Luftabschluss zu ermöglichen. Nach 20 min war das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und sofort ein Kamm zum Aussparen von Probetaschen eingesetzt. Nach 10 min war auch dieses Gel auspolymerisiert, sodass verschiedene Proteinproben aufgetragen und bei 100 V für 3 h aufgetrennt wurden.

### **2.2.3.3 Western Blot mit anschließender Immunfärbung**

Der Western Blot ist ein sensitives Nachweisverfahren für spezifische Proteine in einem Proteingemisch. Zuerst wird dieses durch die Polyacrylamid Gelelektrophorese

entsprechend der Proteingröße aufgetrennt, sodass einzelne Proteinbanden entstehen (vgl. Kap. 2.2.3.2). Die Proteinbanden werden anschließend aus dem Gel auf eine feste Trägermembran transferiert, indem senkrecht zum Polyacrylamid ein elektrisches Feld angelegt wird, wobei Membran und Gel Sandwich-ähnlich zwischen Filterpapier und Zelluloseplatten in eine Blottingkassette gespannt werden. Dieser Vorgang wird ElektrobloTTing genannt. Die Proteine bleiben dabei aufgrund hydrophober Wechselwirkungen im Muster der elektrophoretischen Auftrennung an der Membran haften und sind auf der Nitrozellulose stabiler und für weitere Methoden besser zugänglich.

Das Gel wurde über Nacht bei 18 V geblottet. Dann wurde die Nitrocellulose für die Absättigung überschüssiger Bindungsstellen 2 h in 5% Marvelmilch inkubiert. Die Marvelmilch dieses Inkubationsschrittes wurde 1:10 mit Marvelpuffer verdünnt und für später folgende Waschschrirte aufgehoben. Für die Detektion der Proteine wurde die Nitrozellulose für 90 min in 10 ml 1:50 verdünnten *anti-c-myc tag*-Antikörper in 5% Marvelmilch gehalten. Dieser primäre Antikörper erkennt den c-myc tag der *anti-RCAR1-scFv-ck*-Proteine. Die Nitrozellulose wurde danach drei mal mit der zuvor verdünnten Marvelmilch gewaschen um überschüssige a-c-myc tag-Antikörper zu entfernen. Die Nitrozellulose wurde für 1 h in 10 ml 5%-iger Marvelmilch gehalten. Diese wurde in einer Verdünnung von 1:2000 mit dem Sekundärantikörper, einem Peroxidase markierten Antikörper (anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat), versetzt. Peroxidase wird durch eine Reaktion, bei der energiereiches Licht entsteht, sichtbar gemacht (Towbin *et al.*, 1989). Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper, welcher an *anti-RCAR1-scFv-ck*-Proteine geknüpft ist. Nach fünf weiteren Waschschrirten, dreimal mit verdünnter Marvelmilch und je ein mal mit Marvelpuffer und PBS, erfolgte eine Entwicklung mittels des ECL-Kits auf einem Röntgenfilm.

#### **2.2.3.4 Coomassie-Färbung**

Die Anfärbung der Proteine auf einem SDS-PAA-Gel erfolgt mit dem anionischen Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillantblau G-250. Dieser bindet an kationische, nichtpolare und hydrophobe Bereiche der Proteine und macht sie somit sichtbar. Dabei spielen besonders die Wechselwirkungen mit der basischen Aminosäure Arginin eine große Rolle.

Zur Entfernung von SDS wurde das zu färbende Polyacrylamidgel für 10 min mit Entfärbelösung gewaschen. Anschließend wurde für 30 min Färbelösung zugegeben, damit

sich die Banden entwickeln. Daraufhin wurde das Gel erneut mit Entfärbelösung gewaschen.

## 2.2.4 ELISA

### 2.2.4.1 Indirekter ELISA

Zur funktionellen Charakterisierung der *anti*-RCAR1-scFv-ck-Antikörper wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein quantitatives immunologisches Verfahren zum Nachweis von Antikörper- und Antigenbindungen (Engvall und Perlmann, 1971) auf Mikrotiterplatten unter Verwendung von Enzymen als Marker. Für die Aktivitätsbestimmung von *anti*-RCAR1-Proteinen wurde die ELISA-Platte (*Maxi-Sorp*, *Nunc-Immuno Plate*, Roskilde, Dänemark) über Nacht mit 100 µl/well des Antigens RCAR1, RCAR11, bzw. des RCAR1-B-Fragments beschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Antigen-Lösung wurden freie unspezifische Protein-Bindestellen der ELISA-Platte mit 200 µl/well 3% BSA in Phagen-PBS-T für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach Abgießen der Blockinglösung wurden verschiedene Antikörperversüßungen des *anti*-RCAR1-Antikörpers in 1% BSA in Phagen-PBS-T aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente 3 % BSA in Phagen-PBS-T. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die jeweiligen Wells fünfmal mit Phagen-PBS-T gewaschen. Zur Detektion der gebundenen *anti*-RCAR1-Moleküle wurden je 100 µl/well des *anti*-c-myc tag-Antikörpers (1:100 in 1% BSA in Phagen-PBS-T) aufgetragen, der gegen den c-myc tag der löslichen Nanobodies gerichtet ist. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und fünfmaligem Waschen mit Phagen-PBS-T, wurden je 100 µl/well eines zweiten Antikörpers, *anti*-Maus-ALP (1:2000 in 1%BSA in Phagen-PBS-T), zugegeben und erneut für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase verknüpft, welches durch das Substrat 4-Nitrophenylphosphat (1 mg in 1 ml Substratpuffer je well) der Firma Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, USA) nachgewiesen werden kann. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse des Substrats zu 4-Nitrophenolat unter Abspaltung von Phosphat. 4-Nitrophenolat wird als gelbe Färbung sichtbar und wurde im Versuch nach einstündiger Inkubation bei 37°C bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Lesegerät photometrisch gemessen.

#### 2.2.4.2 Kompetitiver ELISA

Zur Ermittlung der Affinität der spezifischen *anti*-RCAR1 scFv-ck's zum jeweiligen RCAR-Antigen wurden die ELISA-Platten (*Maxi-Sorp, Nun c-Immuno Plate* Roskilde, Dänemark) über Nacht mit 100 µl/well RCAR (1 µg/well) beschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Masterplatte wurde mit 3 % BSA in Phagen-PBS-T abgesättigt. Nach dem Entfernen der RCAR-Lösung wurden freie unspezifische Protein-Bindestellen der ELISA-Platte mit 200 µl/well 3 % BSA in Phagen-PBS für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Auf die Masterplatte wurden 60 µl/well der verschiedenen Verdünnungen des RCAR-Antigens in 1 % BSA in Phagen-PBS-T aufgetragen und mit jeweils 60 µl/well *anti*-RCAR1-scFv-ck in einer Verdünnung von 1:100 versetzt. Die Masterplatte wurde 1h bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine gute Durchmischung und eine 1:2 Verdünnung von Antigen und scFv zu erreichen. Nach Abgießen der Blockinglösung wurde je 100 µl/well von der Master-Platte auf die ELISA-Platte übertragen. Als Negativkontrolle diente 3 % BSA in Phagen-PBS-T. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und die jeweiligen Wells fünfmal mit Phagen-PBS-T gewaschen. Die Detektion der gebundenen Nanobodies erfolgte wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben.



## 3 Ergebnisse und Auswertung

### 3.1 Konstrukterstellung

In der AG Phytoantikörper des IPK Gatersleben wurde bereits 2010 mittels Phage Display das scFv *anti*-RCAR1 selektiert. Dieses Antikörperfragment wurde im Periplasma von *E.coli* produziert und daraus gereinigt. Die cDNA von *anti*-RCAR1 dient als Vorlage für ein neues Konstrukt, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurde. Durch Verkürzung des GS-Linkers und einer Fusionierung mit ck entstand ein neues Konstrukt (*anti*-RCAR1-scFv-ck), dass zur Ausbildung von Dimeren fähig ist.

Nach den Klonierungsarbeiten muss die DNA-Sequenz ein 40 kDa großes scFv-ck-Protein mit His-tag (6x H), cmc-tag (EQKLISEEDL) und KDEL kodieren. Die dazugehörige Aminosäuresequenz ist nachfolgend in Abbildung 6 zu sehen.

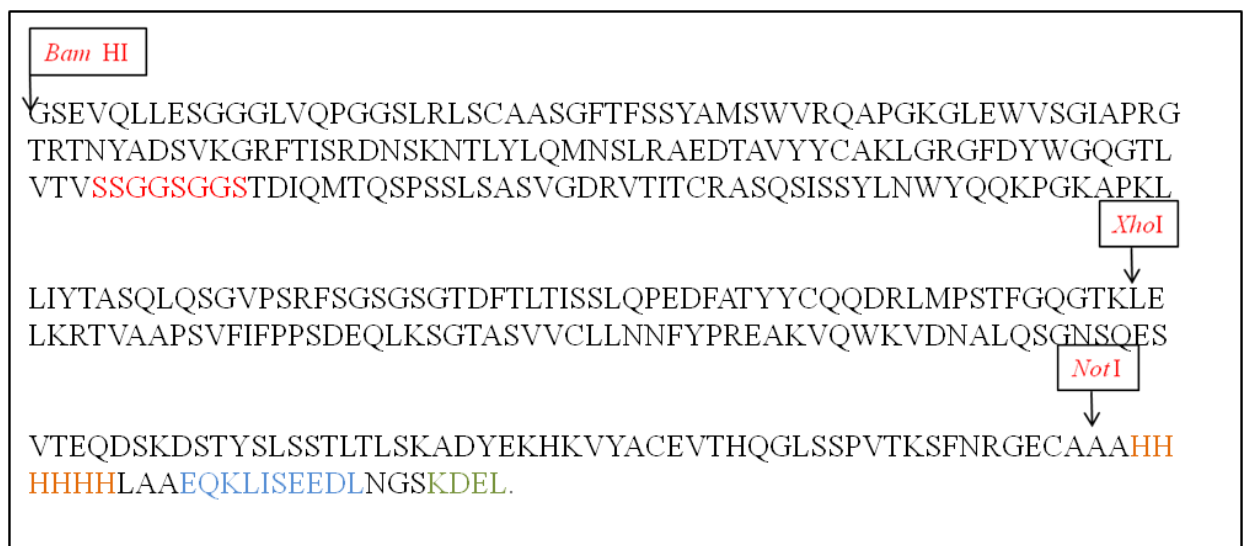


Abbildung 6: Aminosäuresequenz von *anti*-RCAR-scFv-ck. Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI, *Xho*I, *Not*I.

Restriktionsschnittstellen. Zwischen *Bam*HI und *Xho*I: *anti*-RCAR1-scFv, Zwischen *Xho*I und *Not*I: ck, rote Markierung: GSS-Linker, orange Markierung: His-tag, blaue Markierung: cmc-tag, grüne Markierung: Sequenz KDEL.

Abbildung 7 zeigt die wesentlichen Schritte der Klonierung bis hin zur Expression der Antikörperfragmente in Pflanzen.

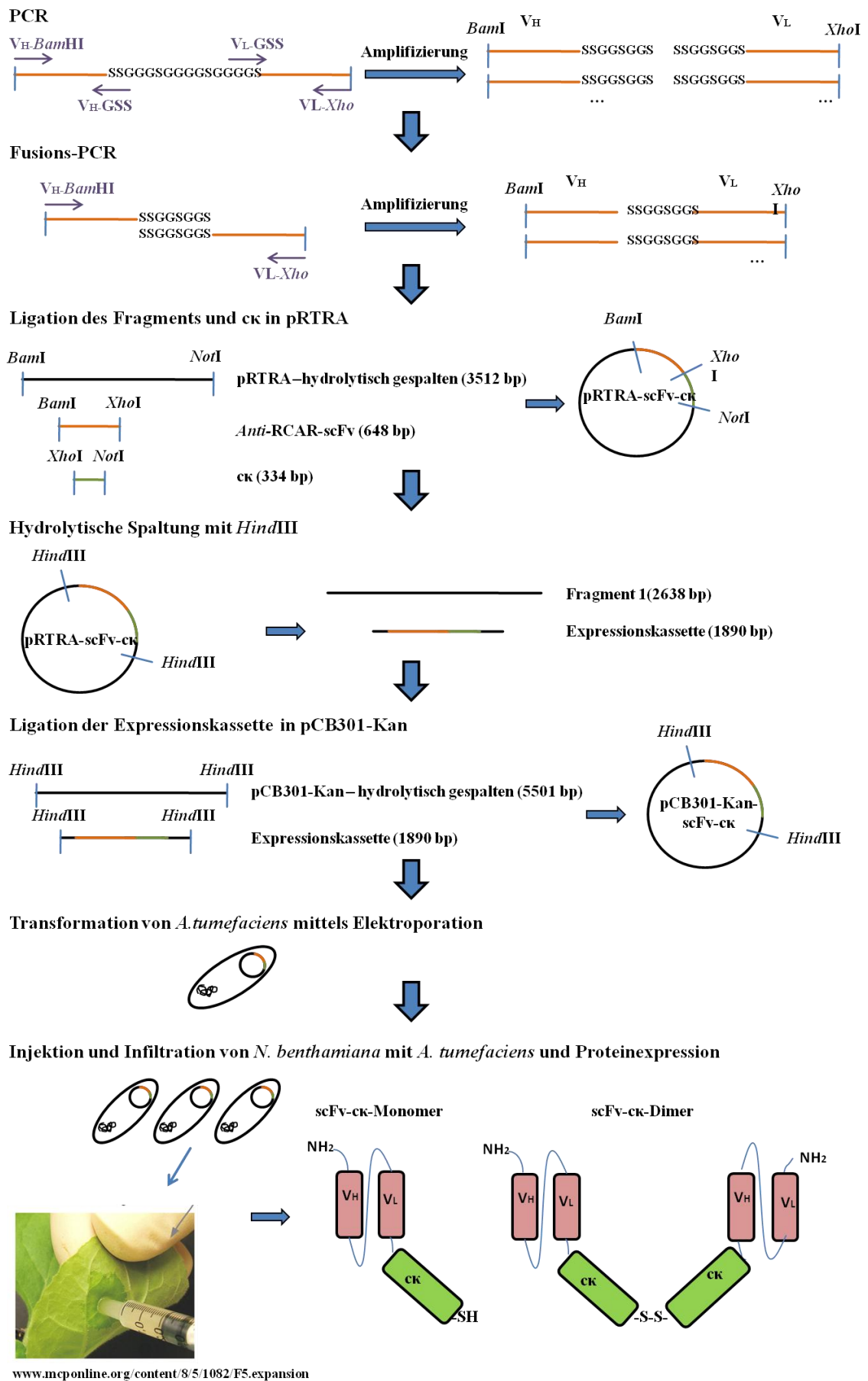


Abbildung 7: Schema der Konstrukterstellung bis hin zur Expression von anti-RCAR-scFv-ck.

*Anti*-RCAR1-scFv wurde zwischen die Schnittstellen *Bam*H1 und *Xho*1 in den Vektor pIT1 kloniert. Die leichte Kette des Antikörperfragments ist mit der schweren Kette durch einen Polypeptidlinker aus Glycin- und Serinmolekülen verknüpft. Damit sich bei der Proteinexpression in Pflanzen Dimere ausbilden, soll der Linker verkürzt werden. Dafür wurde eine PCR benötigt (vgl. Kap. 2.2.1.1). Die für diese Bachelorarbeit verwendeten spezifischen Primer stammen von Eurofins MWG Operon, Ebersberg und werden in Tabelle 16 gezeigt.

**Tabelle 16: spezifische Primer für die PCR.**

Primer	Sequenz	Primereinsatz
V <sub>H</sub> - <i>Bam</i> H1	5'-ttataggatccgaggtgcagctgttggagtctgggggag-3'	<i>Back</i> -Primer
V <sub>H</sub> -GSS	5'-gtacctcccgatccaccgctggagacggtgaccagggttccctggc-3'	<i>For</i> -Primer
V <sub>L</sub> -GSS	5'-tctcagcgggtggatcgggaggttagcacggacatccagatgaccagtc-3'	<i>Back</i> -Primer
V <sub>L</sub> - <i>Xho</i> 1	5'-tttcagctcgagcttggcccttggccgaacgtcgaaggcataag-3'	<i>For</i> -Primer

Zur Amplifizierung der cDNA der schweren Kette des scFv mit Linkersequenz (V<sub>H</sub>-Fragment) wurde V<sub>H</sub>-*Bam*H1 als *Back*-Primer und V<sub>H</sub>-GSS als *For*-Primer verwendet. Die cDNA der leichten Kette des scFv mit GS-Linkersequenz (V<sub>L</sub>-Fragment) wurde m.H. der Oligonukleotide V<sub>L</sub>-GSS (*Back*-Primer) und V<sub>L</sub>-*Xho* (*For*-Primer) amplifiziert.

Für die PCR wurden 2 Reaktionsansätze angesetzt: Der erste zur Amplifizierung des V<sub>H</sub>-Fragments und der zweite zur Amplifizierung des V<sub>L</sub>-Fragments. Die Ansätze besaßen jeweils ein Reaktionsvolumen von 100 µl und unterschieden sich lediglich in der Wahl der Primer. Jeder Reaktionsansatz wurde in vier 25 µl-Aliquots aufgeteilt, die jeweils einer anderen Annealingtemperatur (50°C, 55°C, 58°C und 60°C) ausgesetzt wurden, um einen optimalen Ablauf der PCR zu ermitteln. Die Reaktionsansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

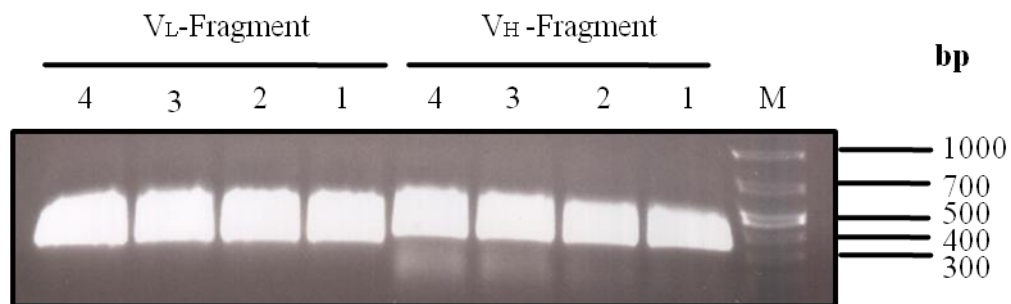
2 µl 10 mM dNTP Mix  
 10 µl Pfu-Puffer (+Mg<sup>2+</sup>)  
 1 µl *forward* Primer  
 1 µl *reverse* Primer  
 1 µl *template* DNA (1:10)  
 2 µl Pfu-Polymerase  
 83 µl dest. Wasser

Tabelle 17 zeigt den detaillierten Ablauf dieser PCR.

**Tabelle 17: Ablauf der PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
<b>Initiation</b>	95 °C	2 min
35 Zyklen		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	45 sec
<b>Annealing</b>	55 °C ( mit Gradient von 5°C)	30 sec
<b>Elongation</b>	72 °C	90 sec
<b>Elongation</b>	72 °C	5 min
<b>Kühlung</b>	4 °C	7 min

Durch eine anschließende Gelelektrophorese konnte die korrekte Amplifikation kontrolliert werden, wobei für das V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Fragment eine DNA-Bande bei 324 Basenpaaren (bp) erwartet wurde. (siehe Abb. 8). Zu erkennen ist, dass Unterschiede bei der Annealingtemperatur keinen Einfluss auf die Stärke der Amplifikation haben.



**Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese nach 1. PCR.**

**M:** Marker (7 µl), **V<sub>H</sub>-Fragment:** amplifizierte cDNA für schwere Kette des scFv mit Linkersequenz (25 µl), **V<sub>L</sub>-Fragment:** amplifizierte cDNA für leichte Kette des scFv mit Linkersequenz (25 µl). Annealingtemperaturen: **1:** 50 °C, **2:** 55 °C, **3:** 58 °C **4:** 60 °C.

Für diese Agarose-Gelelektrophorese wurde jeweils der vollständige PCR-Ansatz aufgetragen. Nach der Auftrennung erfolgte die Isolation der Agaroseabschnitte mit den jeweiligen Banden und die Extraktion der DNA aus der Agarose mittels Qiaquick Gel Extraction Kit (vgl. Kap. 2.2.1.6).

Die beiden einzelnen DNA-Fragmente sollten mittels Fusions-PCR oder auch SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension-PCR) (vgl. Kap. 2.2.1.1) wieder miteinander verknüpft werden. Als Primer wurden bei der Fusions-PCR V<sub>H</sub>-*Bam*, als *Back*-Primer und V<sub>L</sub>-*Xho*, als *for*-Primer eingesetzt.

Dafür wurden folgende in Tabelle 18 aufgelisteten Ansätze gewählt:

Tabelle 18: Zusammensetzung der PCR Ansätze 1-4.

	1A	1B	1C	2 A, 2B	3A, 3B	4
<b>200 nm dNTP-Mix</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<b>PCR-Puffer (Mg<sup>2+</sup>)</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>forward Primer (V<sub>H</sub> Bam)</b>	1 µl	-	1 µl	3 µl	0,5 µl	-
<b>reverse Primer (V<sub>L</sub> Xho)</b>	1 µl	-	1 µl	3 µl	0,5 µl	-
<b>template DNA: Fragment1 (V<sub>H</sub>-GS)</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>template DNA: Fragment2 (V<sub>L</sub>-GS)</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Pfu-Polymerase</b>	1 µl	2 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<b>dest. Wasser</b>	37 µl	37 µl	37 µl	33 µl	38 µl	37 µl

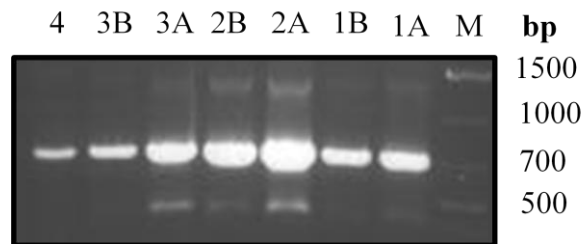
Alle PCR-Ansätze, mit der Ausnahme von Ansatz 4, wurden zu Beginn in den Thermocycler gestellt. Ansatz 4, dem erst keine Primer zugesetzt waren, folgte erst nach 10 PCR-Zyklen, wobei diesem dann 1 µl aus PCR Ansatz 1C dazugegeben wurde.

In Tabelle 19 ist der konkrete Ablauf der Fusions-PCR gezeigt.

Tabelle 19: Detaillierter Ablauf der Fusions-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
<b>Initiation</b>	95 °C	3 min
5 Zyklen		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	1 min
<b>Annealing</b>	60 °C	1 min
<b>Elongation</b>	72 °C	1 min
5 Zyklen		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	1 min
<b>Annealing</b>	50 °C	30 sec
<b>Elongation</b>	72 °C	1 min
Unterbrechung: <b>Ansatz 1b: Zugabe von je 1 µl Primer</b> <b>Ansatz 4: in Thermocycler stellen und Zugabe von 1 µl PCR-Ansatz aus Ansatz 1c</b>	4 °C	5 min
25 Zyklen		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	1 min
<b>Annealing</b>	65 °C	1 min
<b>Elongation</b>	72 °C	90 sec
<b>Elongation</b>	72 °C	5 min
<b>Kühlung</b>	4 °C	7 min

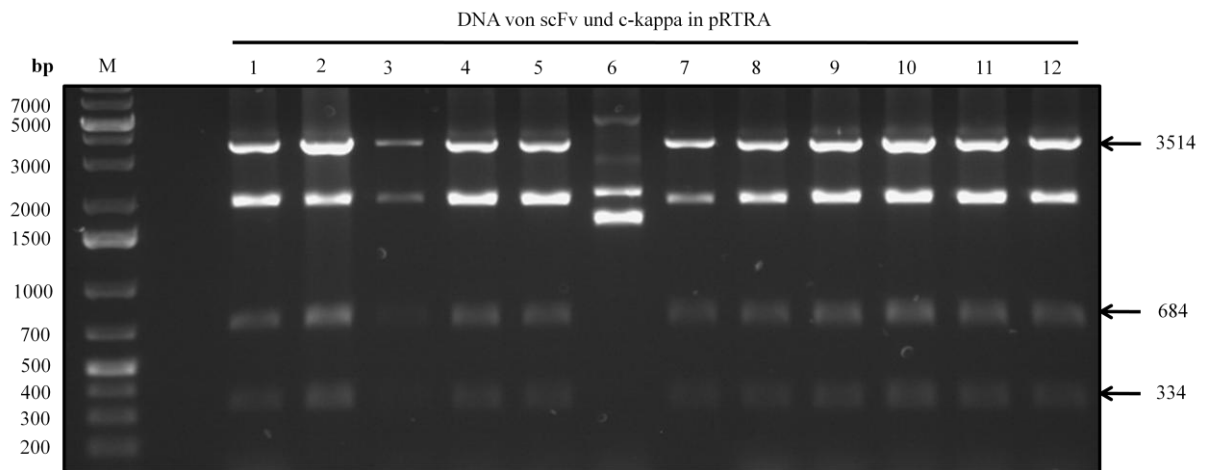
Die korrekte Amplifizierung wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Das Ergebnis der Auftrennung im Agarosegel zeigt die erwartete Zielbande bei 684 bp (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9:** Agarose-Gelelektrophorese nach Fusions-PCR.

**M:** Marker, **1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4:** amplifizierte cDNA des sc-Fv anti-RCAR1 mit verkürzten GSS-Linker in verschiedenen PCR-Ansätzen (je 5 µl Probe).

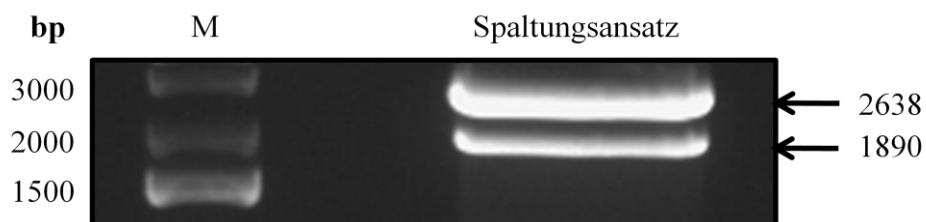
Man erkennt in Abbildung 9, dass im Ansatz 2 aufgrund einer hoch eingesetzten Template-Menge auch viel Ziel-DNA gewonnen werden konnte. Ansatz 3A liefert ebenfalls eine gute Ausbeute. Jedoch wurden bei diesen Proben auch andere DNA-Fragmente amplifiziert, weshalb die *anti*-RCAR1-Sequenz aus den Proben 1A und 1B extrahiert wurde. Im nächsten Schritt wurden die Enden dieser scFv-Sequenz hydrolytisch mit *Bam*HI und *Xho*I gespalten, um kompatibel geschnittene DNA zum Vektor und dem ck-Fragment zu erhalten. Im weiteren Verlauf der Arbeit schließt sich eine Reinigung des gespaltenen DNA-Konstrukts mit Qiaquick Purification Kit an (vgl. Kap. 2.2.1.3). Es folgt die Ligation des Fragments mit ck an der Restriktionsschnittstelle *Xho* in den Vektor pRTRA, der schon *Bam*HI- und *Not*I-geschnitten vorhanden war. Der Vektor konnte mittels Elektroporation in *E.coli* XL1 blue transformiert und die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin angezogen werden. Erfolgreich transformierten Zellen wird eine Ampicillinresistenz vermittelt, so dass sie auf dem entsprechenden Selektionsmedium nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C als Kolonien wachsen. Für die anschließende Minipräparation zur Kontrolle der korrekten Ligation wurden 12 Kolonien gepickt und entsprechend inkubiert (vgl. Kap. 2.2.1.7). Die aus der Minipräparation isolierte DNA wurde mit *Bam*HI, *Xho*I und *Not*I gespalten. Der Spaltungsansatz wurde auf dem Agarosegel aufgetragen, sodass im Gel das 648 bp große scFv-DNA-Fragment, das 334 bp lange ck und der 3514 bp lange linearisierte Vektor, der jedoch auch in zirkulärer oder supercoiled Form vorliegen kann, aufgetrennt wird (siehe Abb. 10).



**Abbildung 70:** Agarose-Gelelektrophorese der Spaltung von pRTRA mit *Bam*HI, *Xho*I und *Not*I.

**M:** Marker, **1- 12:** Fragmente nach Spaltung, **3514 bp:** Vektor pRTRA (linearisierte Form) **684 bp:** DNA des scFv **334 bp:** DNA ck

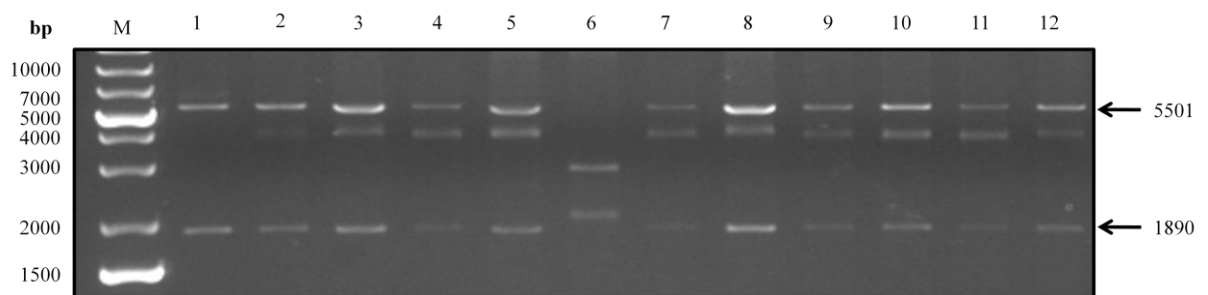
Das Ergebnis zeigt, dass Klon 1-5, sowie 7-12 richtig gespalten wurden und lediglich einer der zwölf Klone (Nr. 6) nicht fehlerhaft war und daher nicht die Fragmente in der Zielgröße aufwies. Klon Nummer 2 wurde (nach Bestätigung der Korrektheit durch Sequenzierung) für die Klonierung in den Expressionsvektor pCB301 ausgewählt. Die zwei *Hind*III Schnittstellen im pRTRA-Vektor erlauben die Übertragung der Expressionskassette in den Vektor pCB-Kan (Scheller *et al.*, 2004). Dieser basiert auf dem Minibinärvektor pCB301, der sich aufgrund seiner geringen Größe leicht manipulieren lässt (Xiang *et al.*, 1999). Die *Hind*-Kassette enthält neben dem DNA-Konstrukt einen 35S-CaMV-Promotor, eine LeB4-Sequenz, die für die Expression des Proteins im ER ausschlaggebend ist, einen his- und c-myc tag, sowie die Aminosäuresequenz KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), die dafür verantwortlich ist, dass exprimierte Proteine im ER zurückgehalten werden (Wandelt *et al.* 1992). Bei der Spaltung des pRTRA-Vektors mit *Hind*III wurden im Gel zwei Fragmente in den Größen 1890 bp (Hind-Fragment) und 2638 bp (pRTRA) erhalten (siehe Abb. 11).



**Abbildung 81:** Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pRTRA mit *Hind*III.

**M:** Marker, **Spaltungsansatz:** pRTRA gespalten mit *Hind*III führt zu 2 Fragmenten, **2638:** Vektor pRTRA (linearisierte Form), **1890:** Hind-Kassette.

Die *Hind*-Kassette wurde aus dem Gel mittels Qiaquick Purification Protocol isoliert, gereinigt und anschließend durch eine Ligation in den Vektor pCB301-Kan, der schon hydrolytisch gespalten vorlag, kloniert. Dabei kann das *Hind*-Fragment in zwei verschiedenen Orientierungen (*forward* und *reverse*) eingebaut werden. Der Expressionsvektor wurde mittels Elektroporation in *E.coli* XL1 blue transformiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert (vgl. Kap. 2.2.2.1). Zur Überprüfung des Ligationsergebnisses wurden 12 Minipräparationen angeimpft. Nach der Reinigung wurde der pCB-Vektor zuerst mit *Hind*III gespalten, sodass im Agarosegel bei 1890 bp eine Bande für das *Hind*-Fragment, sowie bei 5501 bp eine Bande für den linearisierten pCB 301-Vektor erscheint (siehe Abb. 12).

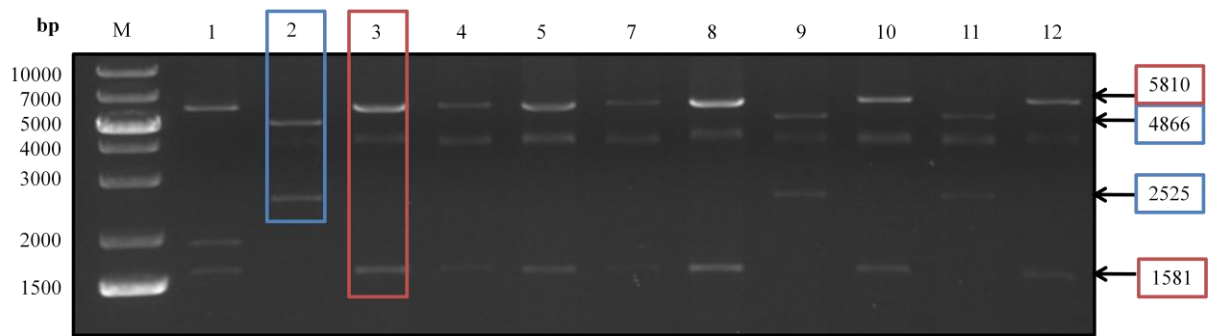


**Abbildung 92:** Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pCB301 (aus *E.coli*) mit *Hind*III.

**M:** Marker, **1-12:** Spaltung der einzelnen Minipräparationen mit *Hind*III, **5501 bp:** Vektor pRTRA (linearisierte Form), **1890 bp:** *Hind*-Kassette.

Anhand des Gels ist erkennbar, dass die Klone 1-5 und 7-12 wie erwartet gespalten wurden. Nur Klon Nummer 6 wurde fehlerhaft gespalten. Weiterhin wurde der Expressionsvektor mit *Nco*I gespalten, um die Orientierung des eingebauten *Hind*-Fragments festzustellen. Für *Nco*I befindet sich eine Restriktionsschnittstelle im pCB-Vektor bei 4186 bp und eine weitere direkt in der dazu klonierten *Hind*-Kassette. Je nachdem, in welcher Orientierung dies eingebaut wurde, ist die Schnittstelle bei 5787 bp (*forward*) oder bei 6711 bp (*reverse*). Die *Nco*I-Spaltung führt beim *forward* eingebauten Fragment zu Banden bei 1581 bp und 5810 bp, wohingegen die Spaltprodukte eines *reverse* eingebauten Fragments bei 2525 bp und 4866 bp liegen. Eine Gelelektrophorese zeigt, dass drei der ausgewählten Klone (Nr. 2, 9 und 11) *reverse* orientiert sind und alle übrigen Klone das Fragment *forward* enthalten (siehe Abb. 13).

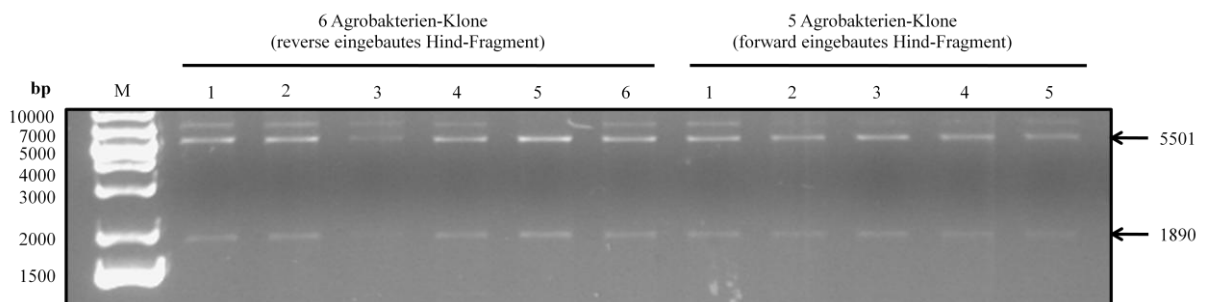




**Abbildung 13:** Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pCB301 mit *NcoI*.

**M:** Marker, **1-12:** Spaltungsansätze der 12 Klone mit *NcoI* **5810 bp, 1581 bp:** Spaltungsergebnisse bei *forward* eingebauten *Hind*-Fragment, **4866 bp, 2525 bp:** Spaltungsergebnisse bei *reverse* eingebauten *Hind*-Fragment.

Klon 2 (*reverse*) und 3 (*forward*) wurden für die Transformation in *A. tumefaciens* ausgewählt. Sie wurden erneut mittels Minipräparationsmethode gereinigt (vgl. Kap. 2.2.1.7) und in Agrobakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.2.1). Die korrekte Transformation wurde durch Animpfen von sechs Minipräparationen für Klon 2 und fünf für Klon 3 mit anschließender Reinigung (vgl. Kap. 2.2.1.7) und Spaltung durch *HindIII* im Agarosegel überprüft (siehe Abb. 14).



**Abbildung 104:** Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung von pCB301 (in *A. tumefaciens*) mit *HindIII*.

**M:** Marker, **1-6:** Spaltung der einzelnen Minipräparationen mit reverse eingebauten *Hind*-Fragment mit *HindIII*, **1-5:** Spaltung der einzelnen Minipräparationen mit forward eingebauten *Hind*-Fragment mit *HindIII* **5501 bp:** Vektor pRTRA (linearisierte Form), **1890 bp:** *Hind*-Kassette.

Das Ergebnis zeigt Banden in Höhe von 1890 bp (*Hind*-Kassette) und 5501 bp (linearisierter Vektor), die von einer korrekten Spaltung zeugen. Aufgrund des Ergebnisses wurden je zwei Klone pro Orientierung (Klon 2.1; 2.5 und Klon 3.2; 3.3) für eine Spritzeninfiltration ausgewählt (vgl. Kap. 2.2.2.2).

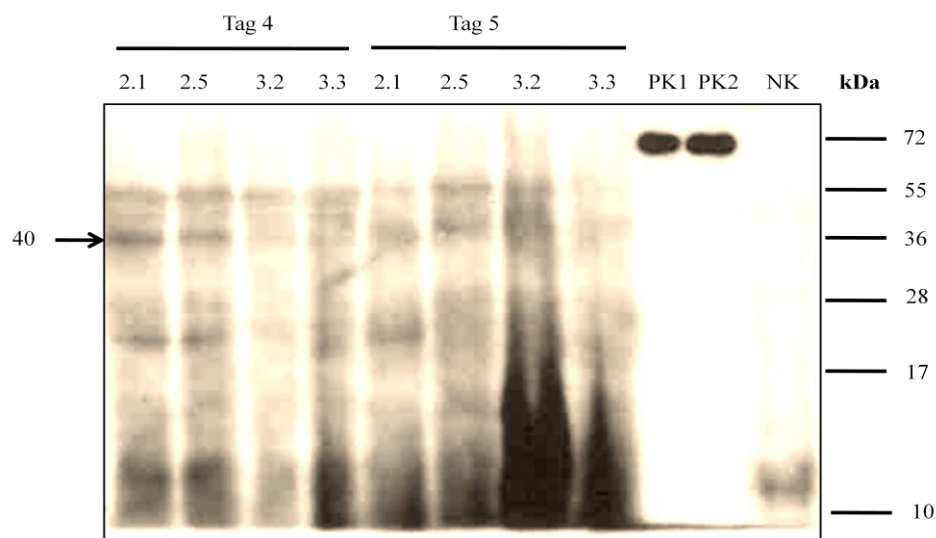
## 3.2 Proteingewinnung – und Analyse

Die vier ausgewählten Klone wurden per Spritzeninfiltration in *N. benthamiana* eingebracht (vgl. Kap. 2.2.2.2). Nach vier und fünf Tagen wurden Blattproben genommen, aufgearbeitet und die Proteinmenge mittels Bradford-Test (vgl. Kap. 2.2.3.1) bestimmt (siehe Tab. 20).

**Tabelle 20: Proteinmenge an Tag 4 und 5 der mittels Injektion vorübergehend transformierten Pflanzen.**

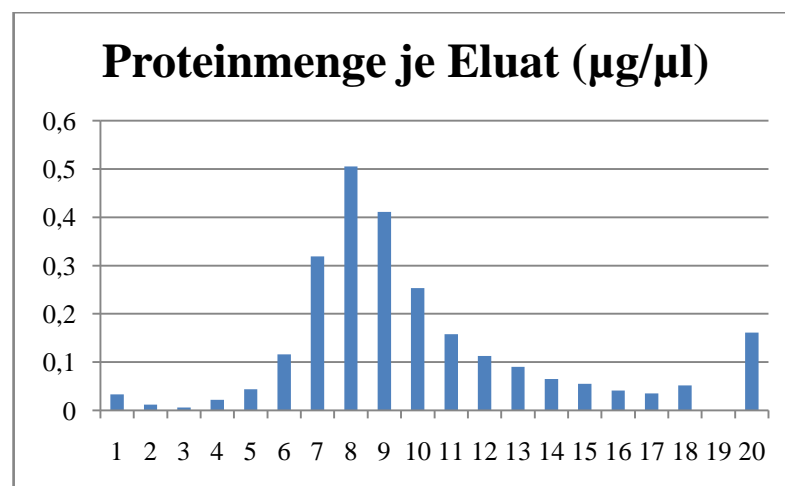
Klon/Probe	Proteinmenge Tag 4	Proteinmenge Tag 5
2.1 ( <i>reverse</i> )	3,7 µg/µl	4,4 µg/µl
2.5 ( <i>reverse</i> )	3,7 µg/µl	2,5 µg/µl
3.2 ( <i>forward</i> )	5,0 µg/µl	3,5 µg/µl
3.3 ( <i>forward</i> )	4,1 µg/µl	2,8 µg/µl

Bis auf Klon Nummer 2.1 ist die Proteinmenge nach fünf Tagen geringer geworden. Diese Variation resultierte aus der jeweiligen Blattprobenstelle und den Unterschieden bei der Proteinreinigung. Die Proteinbestimmung dient dazu, in einer Western Blot-Analyse für jede Probe dieselbe Proteinmenge aufzutragen. Ein Western Blot liefert eine genaue Aussage darüber, in welcher Blattprobe das Zielprotein *anti-RCAR1-scFv-ck* am besten synthetisiert wurde. Daher wurden je 50 µg Protein der acht Blattproben von Tag 4 und 5 in einem SDS-Page aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.3.2). Die Blattproben wurden zuvor in 1x SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol bei 98 °C für 10 min gekocht, um die Proteine zu entfalten und denaturieren. Als Negativkontrolle diente reiner *N.benthamiana*-Rohextrakt, als Positivkontrolle wurde TNF-alpha verwendet, der eine spezifische Bande bei 72 kDa lieferte (siehe Abb. 15).



**Abbildung 115: Western Blot Analyse nach Injektion von *N. benthamiana*.**

Man erkennt, dass nach vier Tagen in den Proben allgemein mehr Proteine vorhanden waren als am fünften Expressionstag. *Anti*-RCAR1-scFv-ck, was eine Größe von 40 kDa besitzt, wurde nur von Pflanzen produziert, die mit einem Klon infiziert wurden, die das *Hind*-Fragment bei der Klonierung in *reverser* Orientierung eingebaut haben (Klon 2.1 und 2.5). Klon 2.1 zeigt bei allen Probeentnahmezeitpunkten eine stärkere Expression des Zielproteins als Klon 2.5 (siehe Abb. 15). Somit wurde Klon 2.1 für eine transiente Expression in 20 *N. benthamiana*-Pflanzen ausgewählt (vgl. Kap. 2.2.2.3). Den Pflanzen wurden nach vier Tagen alle Blätter abgenommen, aus denen in einem Aufarbeitungsverfahren der Rohextrakt gewonnen wurde (vgl. Kap. 2.2.2.4). Die Reinigung der *anti*-RCAR1-scFv-ck-Proteine erfolgte mittels Ni-NTA Agarose (vgl. Kap. 2.2.2.5). Von allen Eluaten der Reinigung wurde die Proteinmenge mittels Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kap. 2.2.3.1) gemessen (siehe Abb. 16).



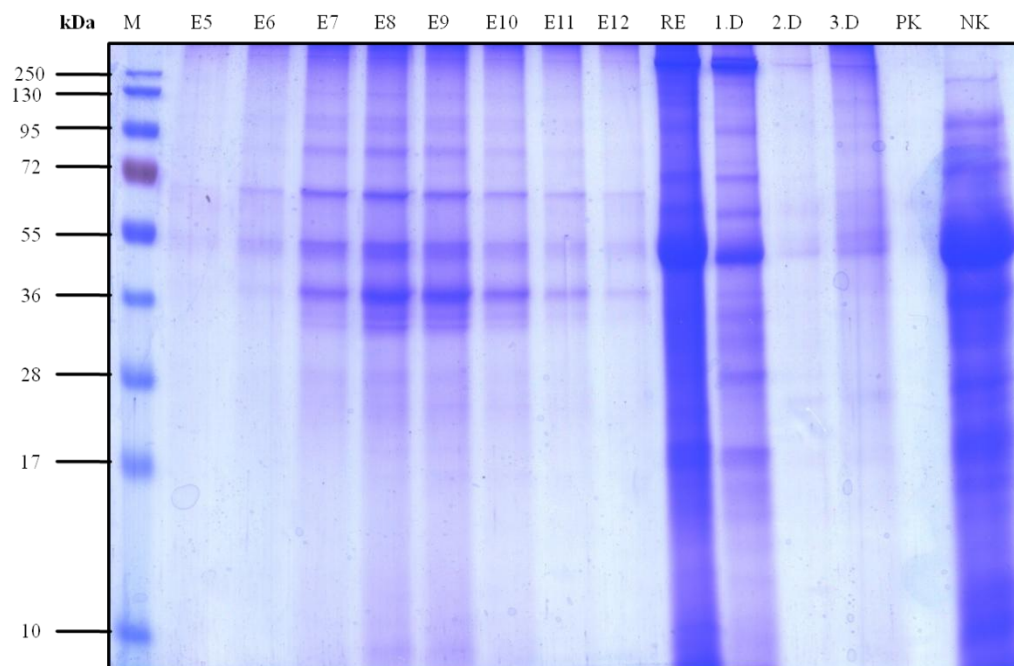
**Abbildung 126: Proteinmenge in den Eluaten der gereinigten scFv's.**

10 µl je Eluat in 290 µl dest. Wasser und 200 µl Bradford-Lösung. Adsorptionsmessung bei 595 nm. Proteinmengenbestimmung aus der Extinktion anhand einer Eichgeraden.

Die Proteinbestimmung zeigt, dass die größte Proteinmenge in Eluat 8 enthalten ist und in weiteren Fraktionen wieder abnimmt.

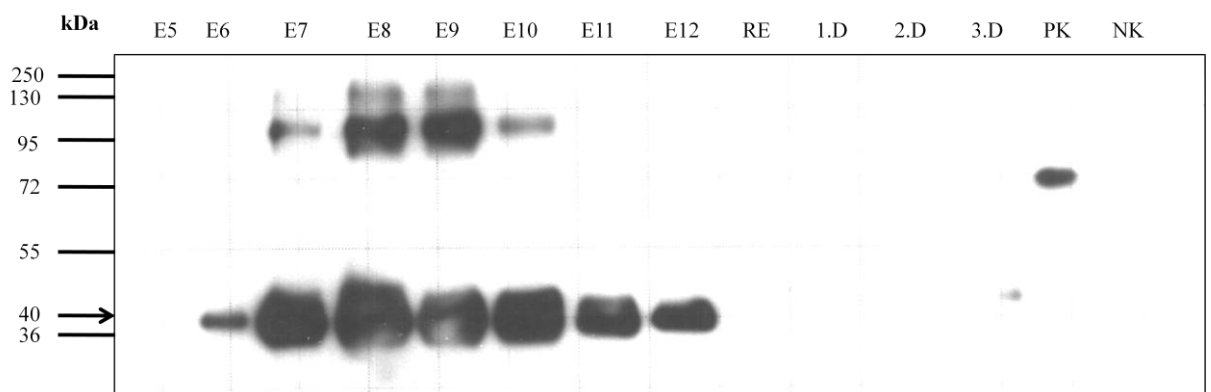
Die affinitätschromatographische Reinigung wurde durch eine Western Blot-Analyse und eine Coomassie-Färbung des SDS-PAA-Gels überprüft. Für die Gele wurden Eluat 5-12, der Rohextrakt, der 1 Durchlauf der Säule des Rohextrakts mit Ni-NTA und der Durchlauf nach Waschen der Säule mit Binde- und Waschpuffer aufgetragen. Negativkontrolle war

*N. benthamiana*-Rohextrakt von nicht-transformierten Pflanzen, Positivkontrolle TNF-alpha (siehe Abb. 17 und 18). Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol für 10 min bei 98 °C inkubiert.



**Abbildung 137: Coomassie-Färbung der Proteinreinigung.**

**M:** Marker (5 µl), **E5-E12:** Eluat 5-12 (30 µl), **RE:** Rohextrakt (30 µl), **1.D:** Durchlauf des Rohextrakts mit Ni-NTA (30 µl), **2.D:** Durchlauf nach Waschen mit Bindepuffer (30 µl), **3.D:** Durchlauf nach Waschen mit Waschpuffer (30 µl) **PK:** Positivkontrolle (1 µl), **NK:** Negativkontrolle (30 µl).



**Abbildung 148: Western Blot der Proteinreinigung.**

**M:** Marker (5 µl), **E5-E12:** Eluat 5-12 (30 µl), **RE:** Rohextrakt (30 µl), **1.D:** Durchlauf des Rohextrakts mit Ni-NTA (30 µl), **2.D:** Durchlauf nach Waschen mit Bindepuffer (30 µl), **3.D:** Durchlauf nach Waschen mit Waschpuffer (30 µl) **PK:** Positivkontrolle (1 µl), **NK:** Negativkontrolle (30 µl).

In der Western Blot-Analyse ist bei Eluat 5-12 das 40 kDa große scFv- $\kappa$ -Monomer zu sehen (siehe Abb. 18), was beweist, dass die affinitätschromatographische Reinigung des

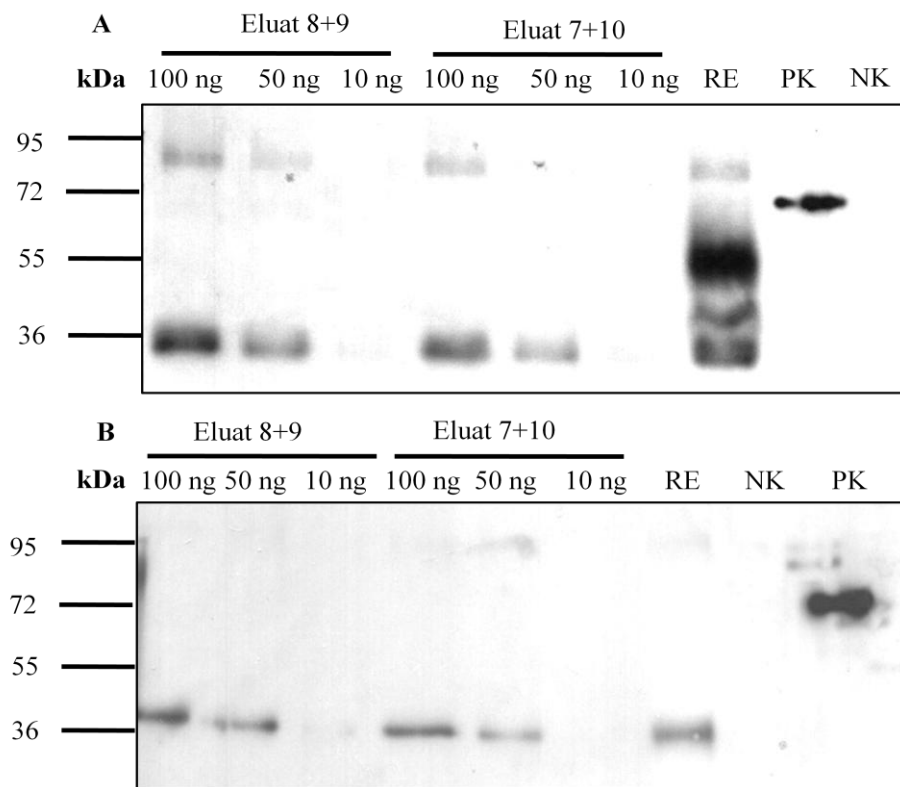
Zielfragments erfolgreich war. Im Coomassie-gefärbten Gel sind ebenfalls Banden bei 40 kDa in allen Eluaten zu sehen. Besonders Eluat 8 und 9 wiesen eine hohe Menge des *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$ -Proteins auf. Außerdem zeigt die Coomassie-Färbung auch Proteinbanden ober- und unterhalb des Zielproteins, was bedeutet, dass auch andere Proteine gereinigt wurden. Eluat 7-10 zeigen vor allem im Western Blot deutlich eine Bande bei etwa 110 kDa. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die Banden lediglich andere *anti*-RCAR-Multimere, die nur aufgrund der hoch aufgetragenen Probenmenge sichtbar wurden. Eine schwache Bande beim 3. Durchlauf (dem letzten Waschschrift) zeigt, dass durch das Waschen der Säule mit einem recht hohen Imidazolanteil (20 mM) ein kleiner Proteinanteil verlorengegangen ist.

Eluat 8 und 9, sowie Eluat 7 und 10 wurden zusammengemischt und die Proteinmenge mittels Bradfordbestimmung (vgl. Kap. 2.2.3.1) auf 0,28  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (E8+9) und 0,22  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (E7+10) bestimmt. Diese Probe stand nun für die physische und funktionelle Charakterisierung bereit.

### 3.3 Charakterisierung der Proteine

#### 3.3.1 Physische Charakterisierung

Die *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$  Proben wurden für die physische Charakterisierung in einem Western Blot analysiert. Die Antikörper wurden einerseits in SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol und andererseits in SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol in einem 10%-igen Trenngel aufgetrennt, mit dem Ziel den Monomer-, Dimer- und Trimer-Anteil zu erfassen. Von Eluat 8+9 sowie Eluat 7+10 wurden jeweils 100 ng, 50 ng und 10 ng aufgetragen. Außerdem wurde der Rohextrakt mit analysiert. Als Positivkontrolle diente TNF $\alpha$ , zur Negativkontrolle wurde *N.benthamiana*-Rohextrakt eingesetzt. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der beiden Western-Blot-Analysen.



**Abbildung 19: Physische Charakterisierung der anti-RCAR-scFv-ck.**

**A:** Proben in SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol, **B:** Proben in SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol, **Eluat 8+9** **Eluat 7+10:** Jeweils zusammengemischte Eluate aus der Proteinreinigung. Aufgetragen wurden jeweils 100 ng, 50 ng und 10 ng **RE:** Rohextrakt, **NK:** Negativkontrolle, **PK:** Positivkontrolle.

Die Western Blot-Analysen zeigen jeweils eine Bande bei 36 kDa. Hierbei handelt es sich mit Sicherheit trotzdem um die eigentlich 40 kDa großen *anti*-RCAR-scFv-ck-Monomere, die in dieser SDS-PAGE etwas anders gewandert sind. Die Proben, denen kein Mercaptoethanol zugesetzt wurden, weisen außerdem noch eine Bande in Höhe von etwa 80 kDa auf, die in der Western Blot-Analyse ohne Mercaptoethanol nicht mehr zu sehen ist. Hierbei handelt es sich damit um ein *anti*-RCAR-Dimer, wofür eine Größe von 80 kDa erwartet wurde. Es ist offensichtlich, dass das Monomer wesentlich häufiger exprimiert wurde. Anhand der Intensität der Banden kann die Verteilung auf etwa 70 % Monomer und 30 % Multimer geschätzt werden. Weiterhin ist eine starke Bande mit einer Größe von etwa 60 kDa im Rohextrakt bei der Western Blot-Analyse A zu sehen, die nach Zugabe von Mercaptoethanol nicht mehr vorhanden ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Komplex handelt. Die Größe des Komplexes spricht dafür, dass *anti*-RCAR-scFv-ck (40 kDa) an den RCAR-Rezeptor (21 kDa) gebunden hat. Allerdings muss diese Komplexbildung erst bei der Herstellung des Rohextraktes zustande gekommen sein, da die *anti*-RCAR-scFv-ck's im RE von *N. benthamiana* Pflanzen exprimiert wurden, wo keine ABA-Rezeptoren vorliegen.

### 3.3.2 Funktionelle Charakterisierung

Der hergestellte *anti*-RCAR1-scFv-ck soll funktionell charakterisiert werden und dabei mit dem Bindungsverhalten des *anti*-RCAR1-scFv-Monomer ohne verkürztem Linker (Expression, Reinigung und Charakterisierung durch Marion Kunze im Verlauf ihrer Bachelorarbeit, 2010) verglichen werden. Die funktionelle Charakterisierung erfolgt durch Ermittlung des Sättigungsbereichs und der Dissoziationskonstanten in indirekten und kompetitiven ELISA-Experimenten. Dabei sollen die Bindungseigenschaften von *anti*-RCAR1-scFv-ck an die Antigene RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 ermittelt werden (Sequenz vgl. Kap. 1.3). Die Antigene wurden von der AG Phytoantikörper bereitgestellt. RCAR11 ist ein weiterer Rezeptor der RCAR-Familie und weist im zentralen Bereich, der Einheit, die das RCAR1-B-Fragment umfasst, eine Aminosäurehomologie von 65% auf. Eine Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kap. 2.2.3.1) zeigte, dass das scFv-Monomer mit einer Konzentration von 12 µg/µl wesentlich stärker konzentriert als der *anti*-RCAR1-scFv-ck-Antikörper (0,28 µg/µl) vorliegt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der Bestimmung des Sättigungsbereichs und der Ermittlung von Dissoziationskonstanten im ELISA der *anti*-RCAR1-scFv-ck-Antikörper wesentlich geringer verdünnt werden muss, um die selbe Absorption zu erhalten.

#### 3.3.2.1 Bestimmung des Sättigungsbereichs und der Dissoziationskonstante von *anti*-RCAR1 durch indirekte ELISA-Experimente

Für die Bestimmung des Sättigungsbereichs dienen indirekte ELISA-Experimente (vgl. Kap. 2.2.4.1). Als Antigene wurden RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 eingesetzt. Die *anti*-RCAR1-Antikörper binden an das Antigen und wurden mit *anti*-c-myc tag-Antikörper und *anti*-Maus-ALP detektiert.

Die schematische Darstellung des ELISA ist in Abb. 20 zu sehen.

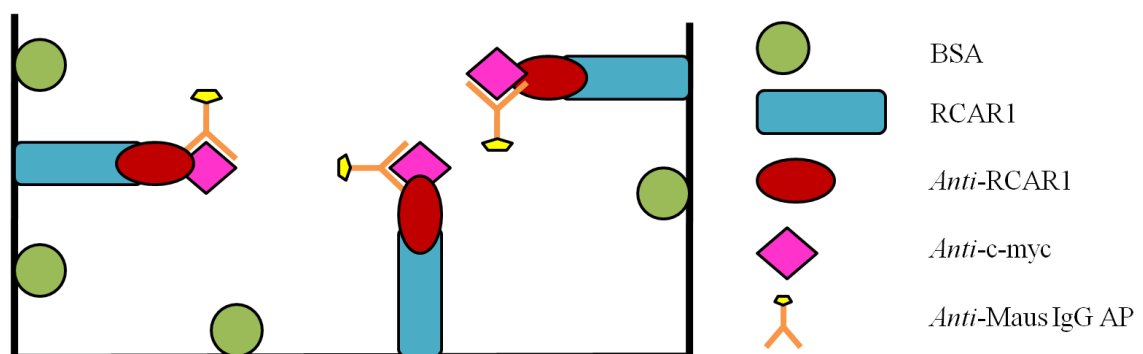
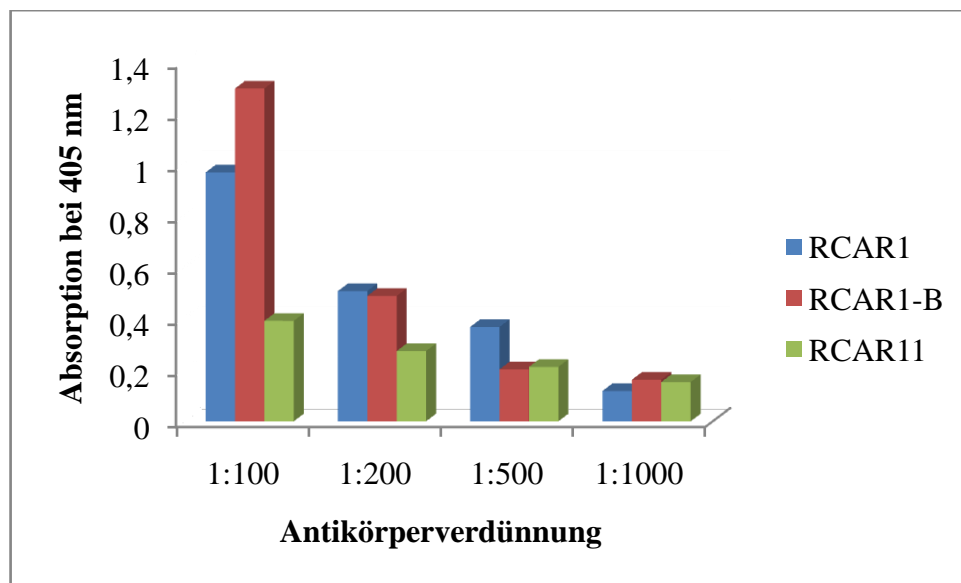


Abbildung 150: indirekter ELISA zur Ermittlung des Sättigungsbereichs.

Das Antigen (RCAR1, RCAR1-B bzw. RCAR11) adsorbiert an der Oberfläche der ELISA Platte. Freie Bindungsstellen werden mit BSA abgesättigt. *Anti*-RCAR1-scFv's und *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$  binden jeweils an die Antigene. An gebundene Nanobodies lagert sich *anti*-c-myc Antikörper an. An anti-c-myc Antikörper bindet anti-Maus IgG AP. Die Farbreaktion entsteht durch Alkalische Phosphatase.

Das Experiment sollte nur mit dem am besten passenden Antigen durchgeführt werden, weshalb zuerst Verdünnungs-ELISA's mit allen Antigenen und *anti*-RCAR-scFv- $\kappa$  durchgeführt wurden. Abbildung 21 gibt einen Überblick über die Absorption bei 405 nm im indirekten ELISA bei einer Antigenbeschichtung von 1  $\mu$ g/well und Antikörperverdünnung von 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000.



**Abbildung 161: Ergebnisse von indirekten ELISA-Studien mit verschiedenen Antigenen.**

Bindung des Antikörpers an verschiedene RCAR-Rezeptoren (RCAR1, RCAR1-B und RCAR11). Antigenkonzentration 1  $\mu$ g/well (verdünnt in Phagen-PBS). Antikörper in 1% BSA in PBS-T. Nachweis mit anti-c-myc 1:100 und anti-Maus-IgG-AP 1:2000 (verdünnt in 1% BSA in PBS-T). Negativkontrolle (3% BSA- in PBS-T) wurde abgezogen. Absorption bei 405 nm.

Abbildung 22 zeigt, dass der Antikörper, wenn auch nur schwach an die drei Antigene gebunden hat. Dabei ist auch zu erkennen, dass RCAR1-B bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 die höchste Absorption aufwies. Ein Wert von 1 wird nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C bei den Absorptionsmessungen angestrebt, da in diesem Bereich die Platte optimal abgesättigt ist, d.h. die Antigene sind hierbei vollständig mit Antikörpern besetzt. Eine Zugabe weiterer Antikörper würde zu einem Austausch mit gebundenen Antikörpern oder bei zu hohen Antikörperkonzentrationen zur Aggregation der Antikörper führen.



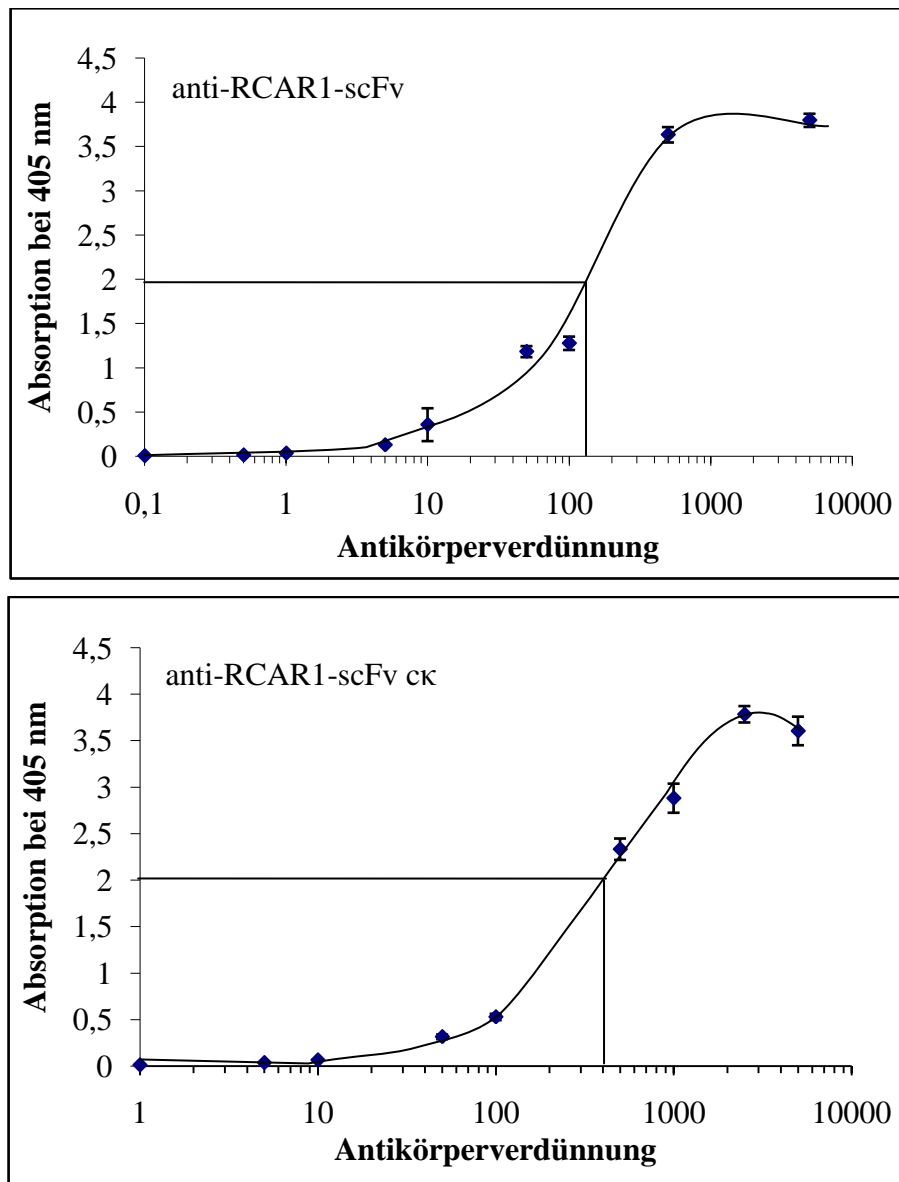
Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ist ein Maß für das Gleichgewicht, welches sich während einer Dissoziationsreaktion einstellt und gibt an, auf welcher Seite der Reaktion das Gleichgewicht der Bindung liegt: das Antigen liegt entweder bevorzugt gebunden oder ungebunden vor. Die Dissoziationskonstante kann mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung von dem Gleichgewicht der vorliegenden Konzentrationen der Komponenten A und B und dem Komplex AB abgeleitet werden:

$$K_D = \frac{[A] \times [B]}{[AB]}.$$

Die Dissoziationskonstante entspricht genau dann der eingesetzten Antigenkonzentration, wenn die Konzentration des Antikörpers viel geringer als die Dissoziationskonstante ist. Dabei ist die Konzentration des Antikörpers im Gleichgewicht ebenso groß wie die Antigen-Antikörperkonzentration. Bei einer Antigenkonzentration der Dissoziationskonstante von 0 liegt ein Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Nanobodies vor, d.h. 50 % sind gebunden und 50 % ungebunden. Je größer  $K_D$ , desto weiter liegt das Gleichgewicht bei der dissoziierten Form. Bezogen auf die Affinität, bedeutet dies: je größer  $K_D$ , desto weniger bindet ein Antikörper. Eine starke Bindung bildet sich also bei einer sinkenden Dissoziationskonstante aus.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante der *anti*-RCAR-scFv's wurde das Antigen RCAR1-B verwendet. Aus dem Diagramm kann die Dissoziationskonstante bestimmt werden, indem die maximal und minimal auftretende Absorption bestimmt wird und genau zwischen dessen beiden Werten (50% Hemmung) das Lot zum Graphen von dessen Position senkrecht zur Ordinaten gezogen wird. Diese Antigenkonzentration entspricht der Dissoziationskonstante.

Die Werte, die bei den Versuchen mit *anti*-RCAR1-scFv-ck erzielt wurden, lagen allerdings noch nicht im Sättigungsbereich (vgl. Abb. 22), weshalb die Dissoziationskonstanten nur abgeschätzt werden können.



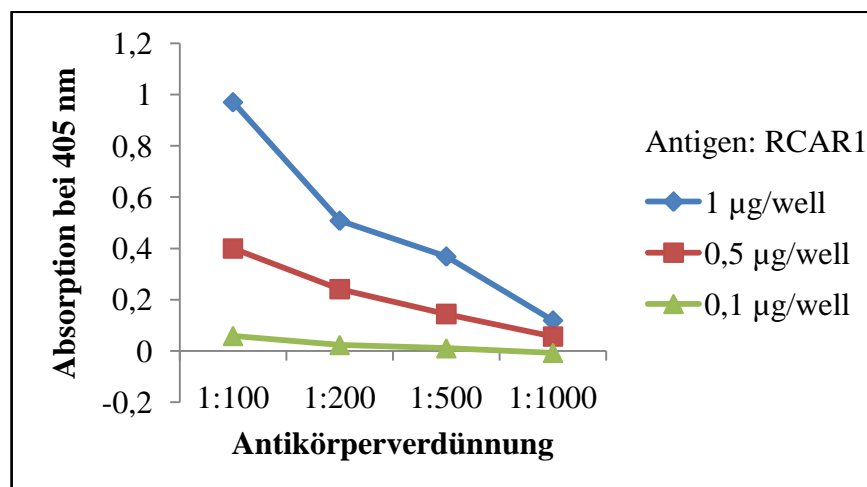
**Abbildung 172: Sättigungskurve des anti-RCAR1-scFv und anti-RCAR1-scFv-ck.**

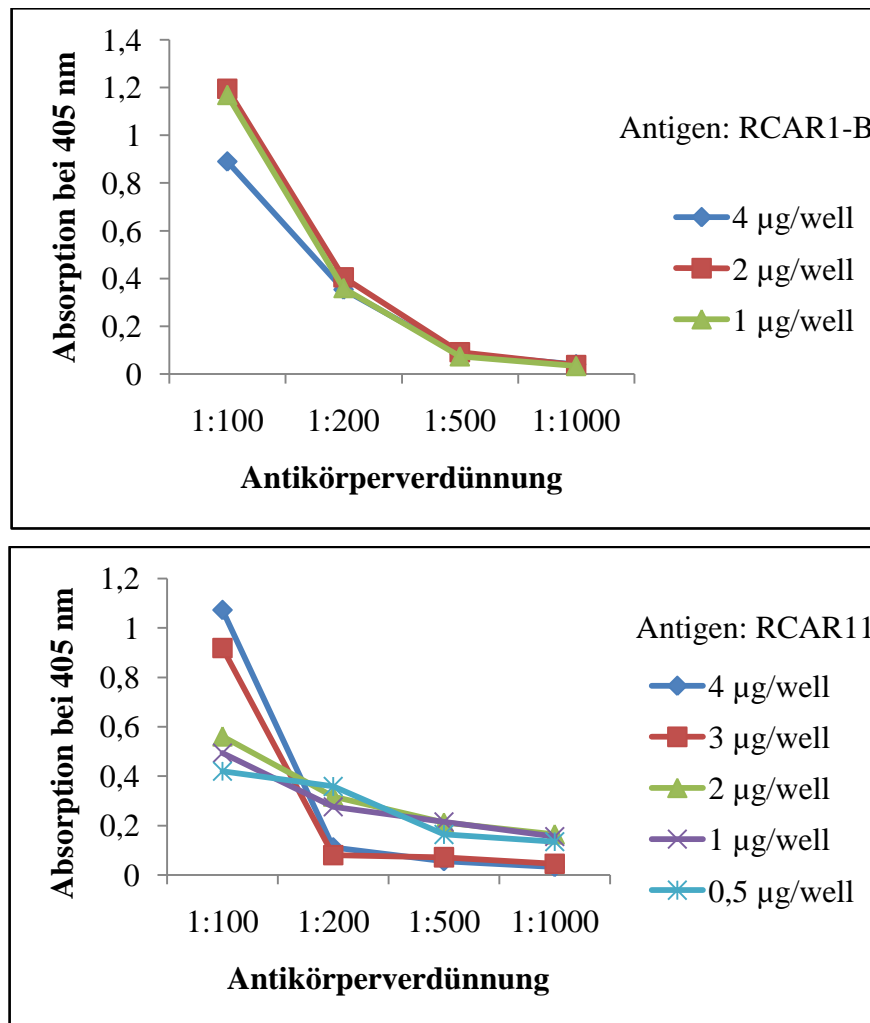
Graphische Auswertung des indirekten ELISA: Bindung des Antikörpers an RCAR1-B. Antigenkonzentration 1 µg/well (verdünnt in Phagen-PBS). Antikörper in 1% BSA in PBS-T. Nachweis mit anti-c-myc 1:100 und anti-Maus-IgG-AP 1:2000 (verdünnt in 1% BSA in PBS-T). Negativkontrolle (3% BSA- in PBS-T) wurde abgezogen. Absorption bei 405 nm. Standardabweichungen sind dem Diagramm zu entnehmen.

Humane, dem Phage Display entstammende scFv-Antikörper besitzen in der Regel eine Dissoziationskonstante von  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-9}$  M. Die Diagramme zeigen, dass sich die Dissoziationskonstanten der *anti*-RCAR-scFv's in diesem Bereich befinden: Für *anti*-RCAR1-scFv wurde ein Wert von 150 nM und für *anti*-RCAR-scFv-ck 400 nM ermittelt. Die Ergebnisse weisen eine verhältnismäßig schwache Bindungsaffinität auf. Wünschenswert wäre eine Dissoziationskonstante im einstelligen nanomolaren Bereich.

### 3.3.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten von anti-RCAR1 durch kompetitive ELISA-Experimente

Um das Bindungsverhalten in Lösung genauer zu vergleichen, soll die Affinität durch kompetitive ELISA-Experimente gemessen werden (vgl. Kap. 2.2.4.2). Diese Methode hat den Vorteil, dass sich beide Bindungspartner in Lösung befinden. Für derartige Tests ist es notwendig, die Antigenmenge an der festen Phase sowie die Antikörperkonzentration zu minimieren. Die eingesetzte Antikörperkonzentration sollte in etwa der Affinitätskonstante entsprechen. Daher wurden erneut mehrere indirekte ELISA durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.4.1), um die optimale Antigenkonzentration von RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 für anti-RCAR1scFv- $\kappa$  zu bekommen. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden verschiedene Antigenbeschichtungen (RCAR1: 1  $\mu$ g/well, 0,5  $\mu$ g/well und 0,1  $\mu$ g/well; RCAR1B: 4  $\mu$ g/well, 2  $\mu$ g/well und 1  $\mu$ g/well; RCAR11: 4  $\mu$ g/well, 3  $\mu$ g/well, 2  $\mu$ g/well, 1  $\mu$ g/well und 0,5  $\mu$ g/well) und Antikörperverdünnungen (1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000) ausgewählt. Die graphische Auswertung der indirekten ELISA-Experimente ist in Abbildung 23 dargestellt.





**Abbildung 183: Spezifische Aktivität von anti-RCAR1-scFv-ck bei verschiedenen Antigenen.**

Graphische Auswertung des indirekten ELISA: Bindung des Antikörpers an RCAR1 (1 µg/well, 0,5 µg/well und 0,1 µg/well), RCAR1-B (4 µg/well, 2 µg/well und 1 µg/well) und RCAR11 (4 µg/well, 3 µg/well, 2 µg/well, 1 µg/well und 0,5 µg/well). Antigen verdünnt in Phagen-PBS. Antikörper in 1% BSA in PBS-T. Nachweis mit anti-c-myc 1:100 und anti-Maus-IgG-AP 1:2000 (verdünnt in 1% BSA in PBS-T). Negativkontrolle (3% BSA- in PBS-T) wurde abgezogen. Absorption bei 405 nm.

Mit Zunahme der Antikörper-Konzentration steigt die Extinktion bei 405 nm. Aufgrund des Optimierungsversuches wurden für die kompetitiven ELISA-Experimente jeweils Antikörperverdünnungen von 1:100 eingesetzt. Die Antigenbeschichtung für den kompetitiven ELISA mit RCAR1 betrug 1 µg/well. Der kompetitive ELISA mit RCAR1-B wurde mit 2 µg/well beschichtet und der mit RCAR11 mit 4 µg/well.

Für die Kompetition wurde das Antigen in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 0,1 nM, 0,001 nM und 0,0001 nM. Bei diesem Versuch wurden die Antikörperfragmente und das Antigen gleichzeitig auf die Maxi-Sorb-Platte gegeben. Dabei konkurrieren die freien und die gebundenen Antigene

um Antikörperbindungsstellen. Abbildung 24 zeigt eine schematische Darstellung eines kompetitiven ELISA.

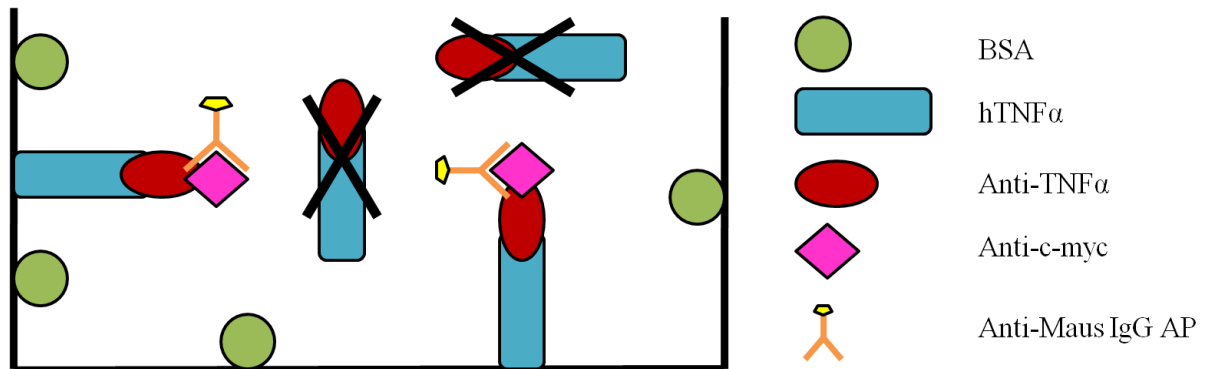
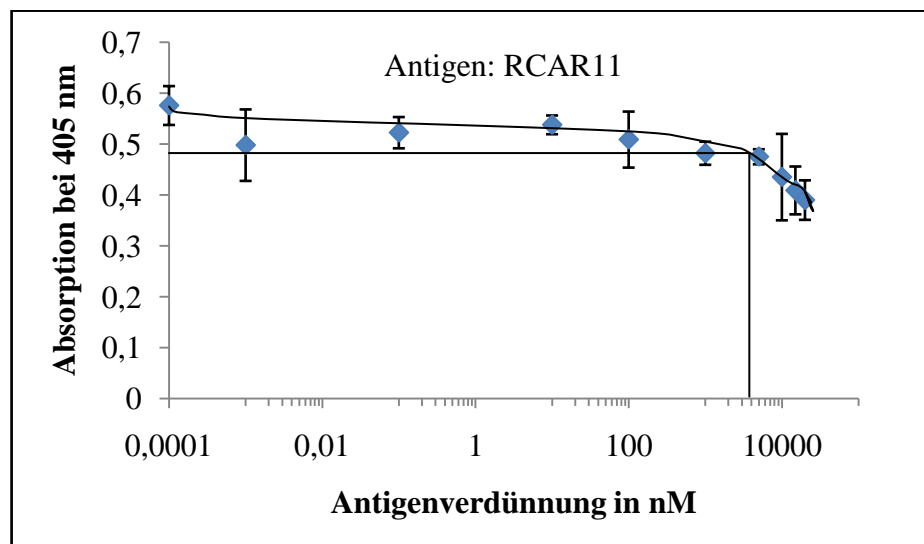
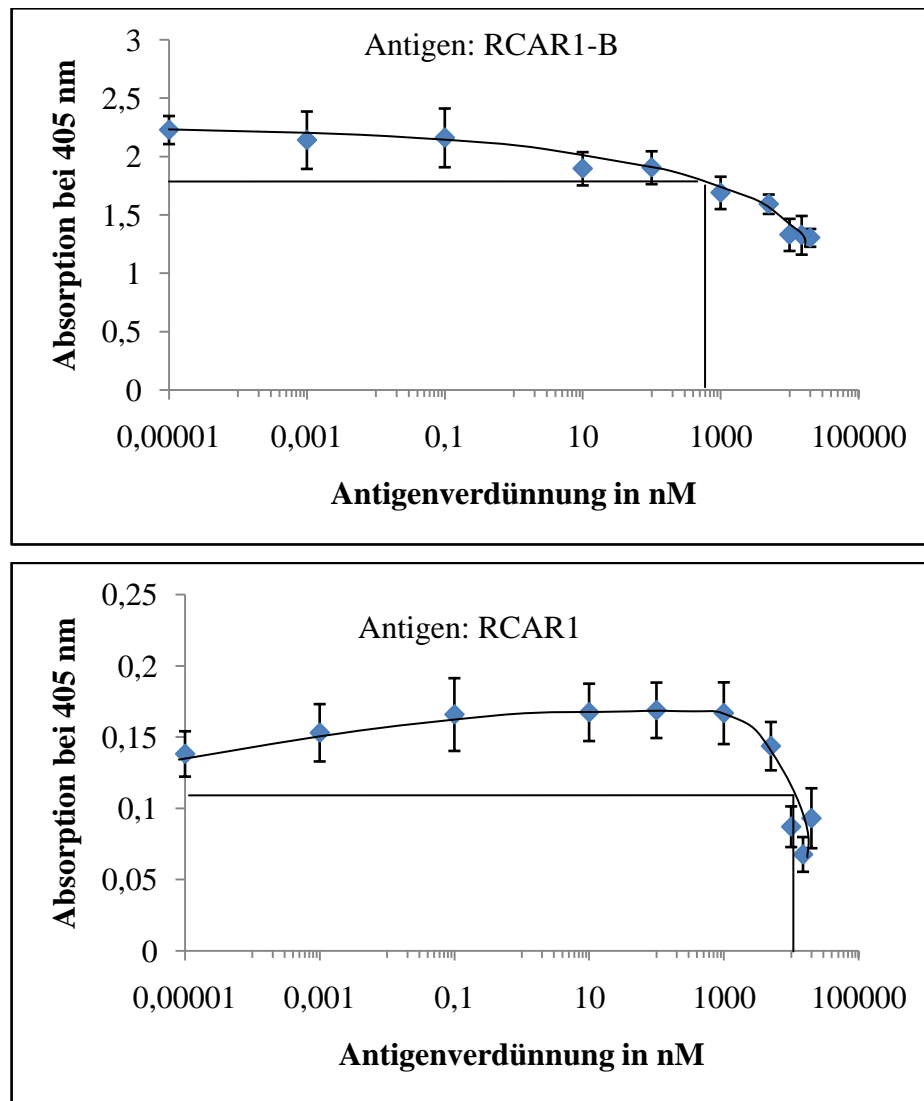


Abbildung 194: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten.

Das Antigen RCAR1, RCAR1-B, RCAR11 adsorbiert an der Oberfläche der ELISA Platte. Freie Bindungsstellen werden mit BSA abgesättigt. Anti-RCARscFv-ck binden an freie und gebundene Antigene. An gebundene Antikörper lagert sich ein anti-c-myc Antikörper an. An anti-c-myc Antikörper bindet Anti-Maus IgG AP. Die Farbreaktion entsteht durch Alkalische Phosphatase.

Da ungebundene Antikörper durch Waschschrte eliminiert wurden, korreliert die Signalstärke direkt mit der Anzahl gebundener Antikörpermoleküle. Abbildung 25 veranschaulicht die Ergebnisse der kompetitiven ELISA-Experimente von *anti*-RCAR1-scFv-ck mit den drei Antigenen.





**Abbildung 205: Bindung von anti-RCAR-scFv-ck an RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 im kompetitiven ELISA.**

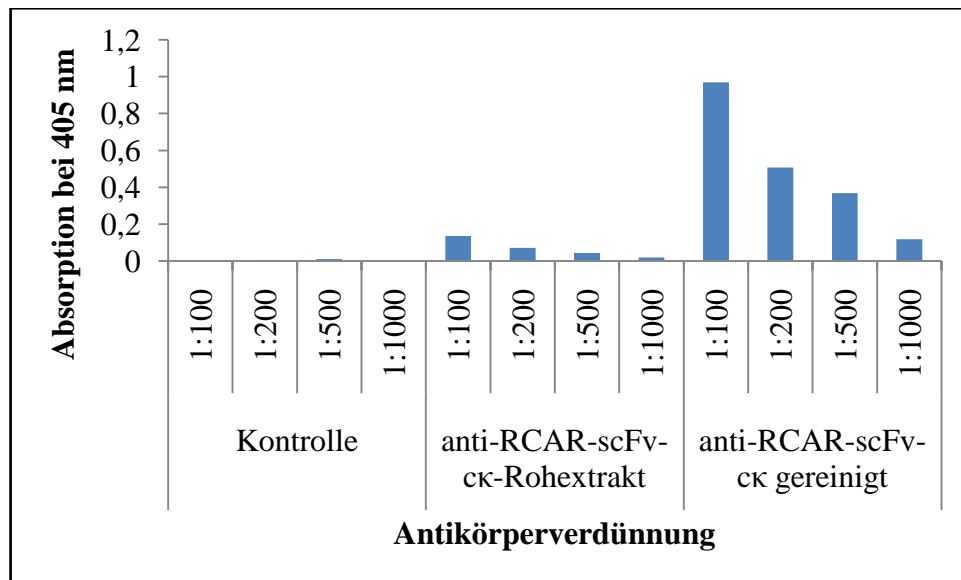
Beschichtung der Maxi-Sorb Platte: RCAR1 (1 µg/well), RCAR1-B (2 µg/well), RCAR11: 4 µg/well; Absättigung mit 3% BSA in PBS-Tween. Zugabe von anti-RCAR1-scFv-ck in einer Verdünnung von 1:100 sowie das jeweilige Antigen in den Molaritäten 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 0,1 nM, 0,001 nM und 0,0001 nM.. Detektion mittels anti-c-myc 1:100 sowie anti-Maus-ALP 1:2000 in 1% BSA in PBS-Tween. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von pNPP in Substratpuffer. Die Standardabweichung ist der Abbildung zu entnehmen.

Der Wert bei 50 %-iger Hemmung (zwischen der maximalen und minimalen Absorption) entspricht der Dissoziationskonstante. Für *anti*-RCAR1-scFv-ck an RCAR1 beträgt sie 2100 nM, an RCAR1-B 550 nM und an RCAR11 4000 nM. Somit wies der Antikörper die beste Bindung zum Antigen RCAR1-B auf, womit das Ergebnis aus Kapitel 3.3.2.1 bestätigt wird. Insgesamt sind diese Dissoziationskonstanten jedoch viel zu hoch, sodass man nur von einer minimalen Bindungsaffinität sprechen kann. Aufgrund der lediglich andeutungsweise entstandenen sigmoiden Kurve sind diese Werte jedoch auch nur geringfügig signifikant. Gründe für den Kurvenverlauf sind die zu hoch gewählten Antigenbeschichtungen und auch die zu hoch eingesetzte Antikörperverdünnung. Für das

nicht-dimerisierte scFv wurde 2010 eine Dissoziationskonstante von 400 nM an das Antigen RCAR1-B bestimmt (Kunze, 2010). Diese Bindung ist also durchaus stärker. Allerdings hat dieses scFv auch keine Linkerverkürzung. Um einen besseren Vergleich anzustreben, müsste daher ein scFv mit verkürzten Linker hergestellt werden, womit geprüft werden könnte, ob die Linkerverkürzung der Grund für die zu hohe Dissoziationskonstante ist. Das ELISA-Experiment zeigte, dass der Antikörper *anti-RCAR1-scFv-ck* an RCAR11 bindet. Allerdings ist die Bindung wesentlich schwächer als zum eigentlichen Antigen RCAR1 bzw. dessen B-Fragment. Trotzdem ist die Homologie ausreichend um die Bindung überhaupt zu ermöglichen.

### **3.3.2.3 Weitere ELISA-Experimente zur Untersuchung der niedrigen Bindungsaffinität**

Eine Hypothese, die die schwache Bindungsaffinität der *anti-RCAR-scFv-ck*-Antikörper erklärt, wurde schon nach der physischen Charakterisierung erörtert (vgl. Kap. 3.3.1): Eine Bindung der Antikörper an ein Antigen im Rohextrakt, möglicherweise den RCAR-Rezeptor. Eine Bindung in der Pflanze während der Expression ist unwahrscheinlich, da die Antikörperfragmente im ER exprimiert wurden. Somit kann eine Bindung nur bei der Herstellung des Rohextraktes in Betracht gezogen werden. Diese Annahme, kann mit einem einfachen indirekten ELISA überprüft werden. Dafür wurde auf einer MaxiSorb-Platte einerseits der Rohextrakt der *anti-RCAR1-scFv-ck*'s und andererseits die gereinigten *anti-RCAR1-scFv-ck*'s aufgetragen. Als Kontrolle diente reiner *N. benthamiana*-Rohextrakt. Die Bindung an das Antigen RCAR1 wurde im indirekten ELISA (vgl. Kap. 2.2.4.1) detektiert. Eine graphische Auswertung des ELISA's ist in Abbildung 26 zu sehen.



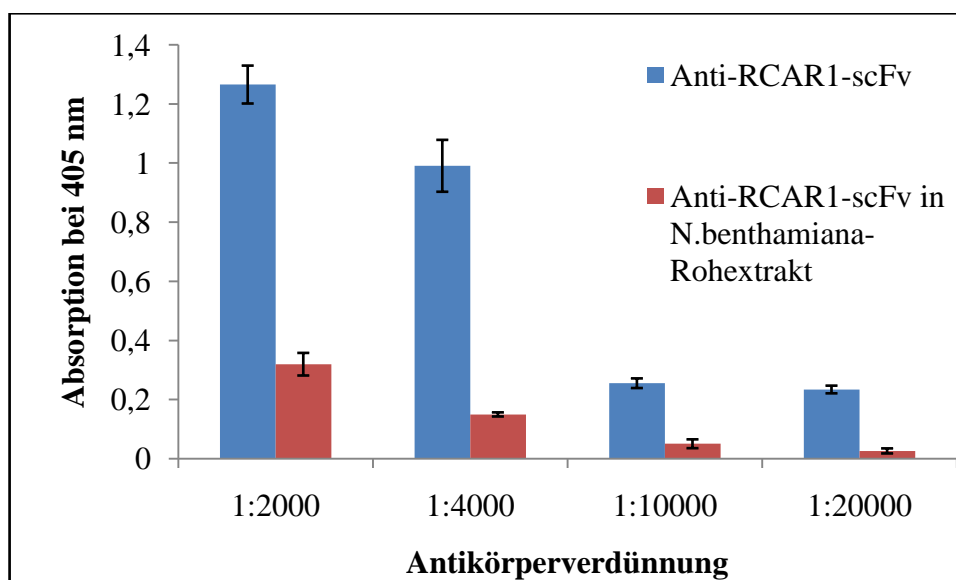
**Abbildung 216:** Untersuchung der Bindung von anti-RCAR-scFv-ck an eine Komponente des Rohextrakts im indirekten ELISA.

Beschichtung der Maxi-Sorb Platte: RCAR1 (1 µg/well). Absättigung mit 3% BSA in PBS-Tween. Zugabe von gereinigtem anti-RCAR1-scFv-ck, anti-RCAR1-scFv-ck-Rohextrakt und einer *N.benthaina*-Rohextraktkontrolle (Verdünnungen: 1:100-1:1000). Detektion mittels anti-c-myc 1:100 sowie anti-Maus-ALP 1:2000 in 1% BSA in PBS-Tween. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von pNPP in Substratpuffer.

Das Diagramm zeigt, dass die Aktivität der anti-RCAR1-scFv-ck im Rohextrakt geringer ist als die der gereinigten anti-RCAR1-scFv-ck (siehe Abb. 26). Dies liefert erste Hinweise auf eine Bindung an den Rezeptor im Rohextrakt. Im Rohextrakt von nicht transformierten *N. benthamiana*-Pflanzen waren keinerlei Antikörper enthalten, die detektiert werden können.

Um nachzuweisen, dass sich im Rohextrakt von Tabakpflanzen Antigene (möglicherweise RCAR-Rezeptoren) befinden, die anti-RCAR1-scFv-ck binden, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierbei wurden die gereinigt vorliegenden, nicht-dimerisierten anti-RCAR1-scFv's in *N.benthamiana*-Rohextrakt verdünnt, für 30 min bei 37 °C inkubiert. In einem indirekten ELISA-Experiment konnte dann ein Vergleich zwischen den aktiven anti-RCAR1-scFv's und den in Rohextrakt inkubierten Antikörpern gezogen werden (siehe Abb. 27). Für den ELISA wurde eine Antigenbeschichtung von 0,1 µg/well gewählt. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:2000, 1:4000, 1:10000 und 1:20000 zugegeben.





**Abbildung 227:** Nachweis der Bindung von *anti*-RCAR-scFv im Rohextrakt von *N. benthamiana* mittels indirektem ELISA.

Beschichtung der MaxiSorb Platte: RCAR1 (0,1 µg/well). Absättigung mit 3% BSA in PBS-Tween. Zugabe von gereinigtem *anti*-RCAR1-scFv und *anti*-RCAR1-scFv inkubiert in *N.benthamiana*-Rohextrakt (Verdünnungen: 1:2000, 1:4000, 1:10000 und 1:20000). Detektion mittels *anti*-c-myc 1:100 sowie *anti*-Maus-ALP 1:2000 in 1% BSA in PBS-Tween. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von pNPP in Substratpuffer. Die Standardabweichung ist der Abbildung zu entnehmen.

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass der Rohextrakt das *anti*-RCAR1-scFv in seiner Aktivität hemmt. Tabelle 22 zeigt den prozentualen Aktivitätsunterschied zwischen dem normalen *anti*-RCAR1-scFv und dem im Rohextrakt inkubierten scFv.

**Tabelle 21:** Prozentualer Unterschied zwischen *anti*-RCAR-scFv und in Rohextrakt inkubierten *anti*-RCAR-scFv.

Antikörperverdünnung	Prozentualer Unterschied
1:2000	75 %
1:4000	85 %
1:10000	80 %
1:20000	89 %

Die zwischen 75 und fast 90 % liegenden Unterschiede weisen deutlich darauf hin, dass im Rohextrakt ein Antigen enthalten ist, was die *anti*-RCAR-scFv's bindet. Die physische Charakterisierung (vgl. Kap. 3.3.1) zeigt im Rohextrakt eine Bande bei 60 kDa (siehe Abb. 19). Diese Größe würde einen *anti*-RCAR-RCAR-Komplex entsprechen, da *anti*-RCAR-scFv-ck eine Größe von 40 kDa aufweist und RCAR 21 kDa groß ist. Jedoch kann man nicht mit voller Gewissheit sagen, dass es sich wirklich um RCAR als Komplexpartner handelt, weshalb weitere Experimente notwendig wären, die in der Diskussion erörtert werden (vgl. Kap. 4).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa\kappa'$ 's erfolgreich in *N. benthamiana* zu exprimieren und zu reinigen. Jedoch ist die Bindungsaffinität nicht, wie erwartet höher als bei dem ursprünglichen *anti*-RCAR1-scFv, da wahrscheinlich im Rohextrakt Komplexe mit dem ABA-Rezeptor gebildet werden.

## 4 Diskussion

Weltweit sind Pflanzen abiotischen Stressfaktoren wie Trockenheit und Salinität ausgesetzt. Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) ist ein zentraler Regulator bei der Reaktion auf Stress und spielt außerdem in zahlreichen Entwicklungsstadien der Pflanze eine Rolle. Die vollständige ABA-vermittelte Signaltransduktion wurde erst 2009 aufgeklärt, als zwei Forschergruppen unabhängig voneinander die Rezeptoren RCAR/PYL und PYR identifizierten (Ma *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009). Genauere Untersuchungen des ABA-Signalwegs können durch die Immunmodulation der ABA-Rezeptoren erlangt werden. Die Immunmodulation basiert auf der Produktion rekombinanter Antikörper in der Pflanzenzelle und der Bindung derer an funktionelle Moleküle, in dem Fall ABA-Rezeptoren. Dadurch wird ein Funktionsverlust herbeigeführt, der wichtige Erkenntnisse zur genauen Aufgabe der Rezeptoren liefert. Ein weiteres analytisches Werkzeug ist die spezifische Immunpräzipitation der jeweiligen Rezeptoren. Der Erfolg solcher Experimente hängt allerdings von der Spezifität und Affinität der rekombinanten Antikörper ab, was eine funktionelle Charakterisierung erfordert. Die Ag Phytoantikörper des IPK Gatersleben hat zu diesem Zweck das scFv *anti*-RCAR1 mittels Phage Display generiert. Dieses Antikörperfragment ist spezifisch gegen den Rezeptor RCAR1 gerichtet und wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit funktionell charakterisiert (Kunze, 2010). Dabei wurde herausgefunden, dass *anti*-RCAR1 eine besonders starke Affinität zum B-Fragment des Antigens aufweist und außerdem eine Bindung an das Antigen RCAR11 stattfindet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Erzeugung von *anti*-RCAR1-scFv's fusioniert mit ck, was zur Ausbildung von Dimeren führt. Dimere Antikörpermoleküle mit zwei Antigenbindungsportoren verfügen oft über eine höhere Bindungsstärke bedingt durch Aviditätseffekte (Giersberg *et al.* 2010). Die *anti*-RCAR-scFv-ck's wurden im ER von *N. benthamiana* erfolgreich exprimiert. Bei der Charakterisierung sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie hoch ist der Anteil an Dimeren scFv's bei der Expression im ER von *N. benthamiana*?
2. Besitzt *anti*-RCAR-scFv-ck eine verbesserte Affinität zu den Antigenen RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 als *anti*-RCAR-scFv-ck?

### 3. Wodurch werden Bindungsunterschiede verursacht und wie kann die Bindungsstärke erhöht werden?

Die erste Fragestellung konnte durch Western Blot-Analysen beantwortet werden, wobei die Proben im Gel einerseits mit und andererseits ohne Zugabe von Mercaptoethanol aufgetrennt wurden. Anhand der Intensität der Banden konnte die Monomer-Dimer-Verteilung auf 70% Monomer und 30 % Dimer geschätzt werden (vgl. Abb. 19, Kap. 3.3.1). Immerhin wurde durch die Herstellung im ER insgesamt eine Dimer-Bildung ermöglicht, da das ER eine oxidierende Umgebung hat, in der Proteasen fehlen und wo durch Anwesenheit von Chaperonen eine korrekte Faltung ermöglicht wird (Ahmad *et al.*, 2010, Conrad & Fiedler *et al.*, 1998). Es besteht auch die Möglichkeit Dimere auf anderen Wegen, als einer Fusion mit ck zu erzeugen. So können Dimere auch über scFv-Fc-Fusionen hergestellt werden, die ebenfalls sehr geeignet für eine Expression in Pflanzen oder Eukaryotenzellen sind. Solche Dimere wurden schon erfolgreich in Pflanzen exprimiert (Van Droogenbroeck *et al.*, 2007). Eine direktere Methode wäre allerdings auch die Fusion von zwei scFv's über eine Linkersequenz. Solche Antikörperdimere können auch in *E.coli* exprimiert werden. Anhand der Proteinbanden bei erwarteter Größe kann noch kein Rückschluss auf deren Aktivität gezogen werden. Daher muss die Funktionalität der Antikörperfragmente aus dem ER bewiesen werden.

Um die Bindungsaffinität an die einzelnen Antigene zu ermitteln, wurden indirekte und kompetitive ELISA-Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen jedoch sehr hohe Dissoziationskonstanten, sodass erkennbar wird, dass die Dimerisierung nicht zur Verbesserung der Bindungseigenschaften geführt hat. Im Gegenteil, ein Vergleich der Dissoziationskonstanten des herkömmlichen *anti*-RCAR1-scFv mit dem *anti*-RCAR1-scFv-ck zeigt, dass die dimerisierte Form zu einer höheren Konstante geführt hat. Humane, dem Phage Display entstammende scFv-Antikörper haben eine Dissoziationskonstante von etwa  $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-9}$  M. Der ursprüngliche *anti*-RCAR-scFv liegt somit in dem Bereich, allerdings mit einer eher schlechten Bindungsaffinität. In Versuchen mit Nanobodies gegen TNF $\alpha$ , die auf die ck-Art dimerisiert wurden, konnten sogar zehnfach verbesserte Dissoziationskonstanten erlangt werden (Giersberg *et al.*, 2010). Daher müssen Erklärungen für die hohe Dissoziationskonstante der *anti*-RCAR1-scFv-ck gefunden werden.

Eine genaue Dissoziationskonstante kann nur ermittelt werden, wenn die Antigene sehr rein vorliegen und die Konzentration unabhängig von Fremdproteinen bestimmt werden kann. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford ist dies nicht der Fall, da der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau in saurer Lösung mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten aller Proteine Komplexe bildet und der Unterschied im Adsorptionsspektrum von ungebundenen und gebundenen Proteinkomplexen somit nur eine quantitative Bestimmung der Proteingesamtmenge erlaubt. Daher ist es möglich, dass aufgrund verunreinigter Antigenproben eine falsche Konzentration und damit auch falsche Antigenkonzentrationen eingesetzt wurden, die wiederum zu einer verfälschten Dissoziationskonstante führten. Eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstante im kompetitiven ELISA war außerdem nicht möglich, da der Antikörper nicht stark genug verdünnt werden konnte und die Antigenbeschichtung sehr hoch war. Exaktere kompetitive ELISA-Experimente könnten durchgeführt werden, indem die Antikörperkonzentration durch Einengung erhöht wird und somit der Antikörper im Experiment in einer stärkeren Verdünnung eingesetzt werden kann.

Die niedrige Affinität der *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$ -Antikörper lässt sich allerdings auch mit einer Fehlfaltung oder einer Bindung an andere Moleküle im Rohextrakt, z.B. den ABA-Rezeptor RCAR1 erklären. Die zweite Möglichkeit trifft mit hoher Wahrscheinlichkeit zu, da schon bei der physischen Charakterisierung eine starke Bande in Höhe von etwa 60 kDa im Rohextrakt bei der Western Blot-Analyse ohne Mercaptoethanol zu sehen ist, die nach Zugabe von Mercaptoethanol nicht mehr vorhanden war. Aufgrund der Größe liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Komplex aus dem 40 kDa großen *anti*-RCAR-scFv- $\kappa$ -Monomer gebunden an einen 21 kDa großen RCAR-Rezeptor handelt. Die Vermutung wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt. So zeigte z.B. ein indirekter ELISA die hemmende Wirkung des Rohextrakts, da die Bindung der *anti*-RCAR-scFv- $\kappa$  an das Antigen RCAR1-B im Rohextrakt kaum detektiert werden konnte, wohingegen nach der Reinigung eine deutlichere Aktivität nachzuweisen war (siehe Abb. 25, Kap. 3.3.2.3). In einem weiteren Experiment wurde die hemmende Wirkung des Rohextrakts nachgewiesen, indem die gereinigt vorliegenden, nicht-dimerisierten *anti*-RCAR-scFv's in *N.benthamiana*-Rohextrakt inkubiert wurden und im indirekten ELISA ein Vergleich zwischen den aktiven *anti*-RCAR-scFv's und den in Rohextrakt inkubierten Antikörpern gezogen werden konnte. Dabei zeigte der Aktivitätsunterschied von bis zu 88 %, dass im Rohextrakt ein Antigen enthalten ist, welches von *anti*-RCAR-scFv's gebunden wird. RCAR's treten, soweit bekannt, ubiquitär in Pflanzen (Monocots und Dicots) auf und

sollten daher auch im Tabak vorhanden sein. Da der scFv-Antikörper gegen das zentrale, stark konservierte Proteinfragment der ABA-Rezeptoren gerichtet ist, kann von einer Kreuzreaktivität mit Tabak-RCAR's ausgegangen werden.

Weitere Experimente, die den Bindungspartner als ABA-Rezeptor RCAR1 identifizieren, können durchgeführt werden. Beispielsweise würde es sich anbieten, RCAR1 im Rohextrakt über spezifische Antikörper in einer Western Blot Analyse oder einem indirekten ELISA nachzuweisen. Allerdings lag dafür noch kein geeigneter Antikörper vor, sodass im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung nicht durchgeführt werden konnte.

Die geringe Bindungsstärke kann zusätzlich auch auf eine Fehlfaltung zurückgeführt werden, die beispielsweise durch die Verkürzung des GSS-Linkers zustande kommen konnte. Eine Dimerisierung der *anti*-RCAR1-scFv's ohne verkürzten Linker und anschließende ELISA-Studien würden Aufschluss darüber geben, ob die Linkerverkürzung tatsächlich eine Rolle spielt. Es ist allerdings bekannt, dass eine Dimerisierung von Nanobodies mit verkürzten Linker erfolgreich mit der ck-Technologie durchgeführt werden konnte (Giersberg *et al.*, 2010).

Um möglichst affine, dimerisierte *anti*-RCAR-scFv's-ck-Dimere zu erhalten, hätte es sich angeboten, die monomeren und dimeren Proteine durch eine Ausschlusschromatographie voneinander zu trennen. Durch diese Methode werden gelöste Proteine nach ihrer Größe in einem porösen Trägermaterial aufgrund der unterschiedlichen Permeation der einzelnen Proteine getrennt und im Anschluss aus der Säule der Reihe nach wieder eluiert (Lottspeich, 2006). Hierbei bietet es sich an, einen direkten Vergleich zwischen den Monomeren und Dimeren *anti*-RCAR-scFv's-ck zu ziehen. Eventuell wäre es auch mit der Ausschlusschromatographie möglich, den Komplex des Monomers mit RCAR1 aus dem Rohextrakt zu isolieren.

Eine weitere Möglichkeit reine, affine *anti*-RCAR-scFv-ck's zu isolieren, besteht darin andere Reinigungsverfahren anzuwenden oder die affinitätschromatographische Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose abzuwandeln, z.B mit Hilfe verschiedener Fällversuche. Es besteht die Möglichkeit, Proteine schonend mit antichaotopen oder kosmotopen Salzen zu fällen. Diese Salze erhöhen die hydrophoben Effekte in der Lösung und fördern über hydrophobe Wechselwirkung die Proteinaggregation. Ein gut geeignetes Salz ist Ammoniumsulfat, das in Konzentrationen oberhalb von 0,5 M die biologische Aktivität der Proteine schützt. Allerdings bringt dieses Verfahren einen zusätzlichen Arbeitsschritt, das Entsalzen der Proteine über Dialyse oder Ionenaustausch, mit sich. (Lottspeich, 2006)

Weiterhin kann eine Reinigung auch mit der Dynabeadmethode durchgeführt werden. Dabei werden Dynabeads (gleichförmige, superparamagnetische Styroporkügelchen) verwendet, um Proteine mit His-tag zu isolieren. Der Vorteil dieser Reinigungsmethode besteht darin, dass die Elutionsbedingungen für die Trennung der gebundenen Proteine von den Beads weniger angreifend wirkt als die affinitätschromatographische Reinigung.

Die Dynabeads können jedoch auch für eine spezifische Immunpräzipitation der Rezeptoren verwendet werden. Bei der klassischen Immunpräzipitation befinden sich beide Partner (Antigen und Antikörper) in Lösung, wobei die Vermischung von Antigenen mit spezifischen Antikörpern zu einem Verlust der Löslichkeit und nachfolgend zur Fällung führen. Der Löslichkeitsverlust wird durch die Antigen-Antikörper-Komplexbildung verursacht. Bei einem maximalen Immunpräzipitat ist im Überstand weder Antigen noch Antikörper enthalten, was bedeutet, dass die beiden Bindungspartner *in toto* kreuzvernetzt sedimentiert sind. Der Antikörper kann jedoch auch an Dynabeads gekoppelt werden und über seine Affinität ein spezifisches Antigen in einer Lösung binden. Die magnetischen Dynabeads können mitsamt der Antikörper und allen Interaktionspartnern aus dem Proteingemisch heraus präzipitiert werden. Nach der Elution kann das präzipitierte Protein beispielsweise im Western Blot nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit zur Gewinnung reiner affiner *anti*-RCAR-scFv-ck's ist, statt der klassischen Agrobakteriuminfiltration die Magniffection Technologie von Icon Genetics anzuwenden, die eine Akkumulation hoher Raten von verschiedenen rekombinanten Proteinen liefert (Gleba *et al.*, 2004, Marillonnet *et al.*, 2006). Dieses Verfahren, das die hohe Transformationseffizienz der *Agrobakterien* mit der hohen Expressionsrate der viralen Vektoren vereint, führt zu einem Akkumulationslevel von über 40 % (Gleba *et al.*, 2004).

Außerdem könnte man das *anti*-RCAR-scFv-ck mit Elastin-ähnlichen Polypeptiden (ELP's) versehen, sodass eine Reinigung mittels ITC-Verfahren möglich ist. ELP's, die Wiederholung der Pentapeptide Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (Xaa: eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin), ertragen einen reversiblen inversen Temperaturwechsel. Solange die Temperatur unter einen bestimmten Umschlagpunkt bleibt, ist ELP gut in Wasser löslich. Geht die Temperatur über diesen Punkt hinaus, ist ELP einem Phasenübergang ausgesetzt, der in einem unlöslichen Zustand und der Aggregation des Polypeptids mündet (Urry *et al.*, 1997). Die durch Temperaturänderung herbeigeführte inverse Transition wird auch beibehalten, wenn ELP an ein Protein fusioniert ist. Daher können die Proteine in einer nicht-chromatographischen, durch Temperaturänderung

hervorgerufenen Phasen-Trennung gereinigt werden (Meyer *et al.*, 1999). Die Anwendung der ELPylierung wurde für die Proteinproduktion in Pflanzen vielfach beschrieben (Übersicht bei Floss *et al.*, 2009).

Erst wenn *anti*-RCAR-scFv-ck-Antikörper gefunden wurden, die den RCAR1-Rezeptor tatsächlich mit hoher Affinität binden und ebenfalls garantiert werden kann, dass die Antikörperfragmente im pflanzlichen Cytosol aktiv sind, kann eine stabile Pflanzentransformation durchgeführt werden. Stabil transformierte Pflanzen können dann hinsichtlich ihres Geno- und Phänotyps untersucht werden. Zu erwarten ist dabei eine ähnliche Veränderung wie bei der Produktion von *anti*-ABA-Antikörpern in *N. tabacum*, da trotz ABA-Produktion ein Weiterleiten des Signals nicht gewährleistet wird. Folglich könnte es zu einem langsameren Wachstum der Blätter, Hypersensitivität bei Wasserstress, einer höheren ABA-Konzentration und offenen Stomata trotz hoher CO<sub>2</sub> Konzentrationen kommen (Artsaenko *et al.*, 1995).



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Bachelorarbeit wurde ein gegen RCAR1 gerichteter Einkettenantikörper (*anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$ ) exprimiert, gereinigt und sowohl physisch als auch funktionell charakterisiert.

Die Herstellung des scFv's erfolgte ausgehend von dem Einkettenantikörper *anti*-RCAR1-scFv (Herstellung, Reinigung und Charakterisierung durch Marion Kunze, 2010). Eine Verkürzung des GSS-Linkers und eine Fusionierung mit der kappa-leichten Kette ( $\kappa$ ) führte zur Ausbildung von Dimeren. Dieser Antikörper wurde im ER von *N. benthamiana* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Western Blot-Analysen zeigen, dass es sich bei etwa 30 % der produzierten *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$ 's um Dimere handelt und etwa 70 % als Monomer hergestellt wurden. In indirekten und kompetitiven ELISA-Experimenten wurde die Bindungsaffinität des Antikörpers zu den Antigenen RCAR1, RCAR1-B und RCAR11 bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindung zu RCAR1-B die beste Affinität liefert (indirekter ELISA: 400 nM, kompetitiver ELISA: 2100 nM). Im Vergleich zum ursprünglichen *anti*-RCAR1-scFv ohne  $\kappa$ , mit langem Linker (indirekter ELISA: 150 nM, kompetitiver ELISA: 400 nM) konnte aber nicht die erhoffte Verbesserung gefunden werden. Daher wurden weitere ELISA-Experimente durchgeführt, um den Grund der niedrigen Affinität zu erforschen. Dabei weisen die Ergebnisse der ELISA-Studien auf eine Komplexbildung der *anti*-RCAR1-scFv- $\kappa$ 's mit einem Antigen bei der Herstellung des Rohextrakts hin. Eine Western Blot-Analyse des Rohextrakts zeigte eine Bande, die der Größe des Antikörpers mit RCAR1 entspricht, weshalb der Rezeptor als Bindungspartner in Frage kommt.

Insgesamt ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, Antikörperfragmente mit ausreichender Bindungsaffinität gegen RCAR1 zu charakterisieren.

# Literatur

Ahmad, A., EO. Pereira, AJ. Conley, AS. Richman, R. Menassa (2010). "Green Biofactories: Recombinant protein production in plants." *Recent Pat Biotechnol* **4**(3): 242-259.

Artsaenko, O., M. Peisker, U. zur Nieden, U. Fiedler, EW. Weiler, K. Müntz, U. Conrad (1995). "Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco." *Plant J* **8**(5): 745-750.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254

Castaldello, J.: Expression von RCAR1-Fragmenten in *E.coli*; Praktikumsarbeit Hochschule Anhalt (FH)/ Köthen, 2010.

Chapman, S, T. Kavanagh, D. Baulcombe (1992). "Potato virus X as a vector for gene expression in plants." *Plant J* **2**(4): 549-557.

Conrad, U. and U. Fiedler (1998). "Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity." *Plant Mol Biol* **38**(1-2): 101 - 109.

Conrad, U. and R. Manteuffel (2001). "Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells." *Trends Plant Sci* **6**(9): 399-402.

Conrad, U. and J. Scheller (2005). "Considerations on antibody-phage display methodology." *Comb Chem High Throughput Screen* **8**(2): 117-126.

- Cutler, S.R., PL. Rodriguez, RR. Finkelstein, SR. Abrams (2010). "Abscisid Acid: Emergence of a core signaling network." *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry* **8**(9): 871-874.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi, C. Steber (2008). "Molecular aspects of seed dormancy." *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387-415.
- Floss, D., K. Schallau, S. Rose-John, U. Conrad, J. Scheller (2010). "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application." *Trends Biotechnol* **28**(1):37-45.
- Fujii H, V. Chinnusamy, A. Rodrigues, S. Rubio, R. Antoni, SY. Park, SR. Cutler, J. Sheen, PL. Rodriguez, JK. Zhu (2009). "In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway." *Nature* **462**(7273): 660-664.
- Gahrtz, M. and U. Conrad (2009). "Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies." *Methods Mol Biol* **483**: 289-312.
- Giersberg, M., D. M. Floss, S. Kipriyanov, U. Conrad , J. Scheller (2010). "Covalent dimerization of camelidae anti-human TNF-alpha single domain antibodies by the constant kappa light chain domain improves neutralizing activity." *Biotechnol Bioeng* **106**(1): 161-166.
- Gleba, Y., V. Klimyuk, S. Marillonnet (2005). "Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants." *Vaccine* **23**(17-18): 2042-2048.
- Goodin, M. M., RG. Dietzgen, D. Schichnes, S. Ruzin, AO. Jackson (2008). "pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves." *Plant J* **31**(3): 375-383.

Goodin, M. M., D. Zaitlin, RA. Naidu, SA. Lommel (2008). "Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant-pathogen interactions." *Mol Plant Microbe Interact* **21**(8): 1015-1026.

Graw, J.: Genetik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2010.

Grill E., [erwin.grill@wzw.tum.de](mailto:erwin.grill@wzw.tum.de), Pflanzen im Stress, URL: [portal.mytum.de/pressestelle/faszination-forschung/2010nr7/index\\_html](http://portal.mytum.de/pressestelle/faszination-forschung/2010nr7/index_html), verfügbar am 13.09.2011

Holliger, P. And PJ. Hudson (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." *Nat Biotech* **23**(9): 1126-1136.

Janeway, C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.: Immunologie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin 2002.

Jobling, S. A., C. Jarman, MM. Teh, N. Holmberg, C. Blake, ME. Verhoeyen (2003). "Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments." *Nat Biotechnol* **21**(1): 77-80.

Kim, T.H., M. Böhmer, H. Hu, N. Nishimura, JI. Schroeder (2010). "Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling." *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561-591.

Klein, C.: "Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente gegen sekundäre Arzneipflanzenmetabolite"; Dissertation Johan Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, 2004.

Kogan F.N. (1997). "Global drought watch from space." *Bull Am Meteorol Soc* **78**(): 621-636.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-497.

Kumagai M.H, J. Donson, G. della-Cioppa, D. Harvey, K. Hanley, LK. Grill (1995). "Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1679-1683.

Kunze, M.: Charakterisierung des Abscisinsäure-Rezeptor bindenden Antikörpers *anti-RCAR1*; Bachelorarbeit Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2010.

Lottspeich, F., Zorbas H.: *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin 2006.

Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann, E. Grill (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." *Science* **324**(5930): 1064-1068.

Marillonnet, S., C. Thoeringer, R. Kandzia, V. Klimyuk, Y. Gleba, S. Werner (2005). "Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants." *Nat Biotechnol* **23**(6): 718-723.

Melcher, K., L. M. Ng, XE. Zhou, FF. Soon, Y. Xu, KM. Suino-Powell, SY. Park, JJ. Weiner, H. Fujii, Y. Chinnusamy, A. Kovach, J. Li, Y. Wang, J. Li, FC. Peterson, DR. Jensen, EL. Yong, BF. Volkman, SR. Cutler, JK. Zhu, HE. Xu (2009). "A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors." *Nature* **462**(7273): 602-608.

Meyer, DE. and A. Chilkoti (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nat Biotech* **17**(11): 1112-1115.

Miroshnichenko, S, J. Tripp, U. Niden, D. Neumann, U. Conrad, R. Manteuffel (2005). "Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures." *Plant J* **41**(2): 269-281.

Mülhardt, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 1999.

Owen, M., A. Gandeche, B. Cockburn, G. Whitlam (1992). "Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco." *Biotechnology (N Y)* **10**(7): 790-794.

Park, S. Y., P. Fung, N. Nishimura, DR. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, TF. Chow, SE. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, NJ. Provart, D. Desveaux, PL. Rodriguez, P. McCourt, JK. Zhu, JI. Schroeder, BF. Volkman, SR. Cutler (2009). "Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." *Science* **324**(5930): 1068-1071.

Scheller, J., K.-H. Guhrs, F. Grosse, U. Conrad (2001). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato." *Nat Biotech* **19**(6): 573-577.

Sheard, L. B. and N. Zheng (2009). "Plant biology: Signal advance for abscisic acid." *Nature* **462**(7273): 575-576.

Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." *Biotechnology* **24**: 145-149.

Umezawa, T., K. Nakashima, T. Miyakawa, T. Kuromori, M. Tanokura, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2010). "Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport." *Plant Cell Physiol* **51**(11): 1821-1839.

Urry, DW. (1997) "Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers" *J Phys Chem B* **101**(...):11007-11028.

Van Droogenbroeck, B., J. Cao, J. Stadlmann, E. Altmann, S. Colanesi, S. Hillmer S, DG. Robinson, E. Van Lerberge, N. Terryn, M. Van Montagu, M. Liang, A. Depicker, G. De Jaeger (2007). "Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(4): 1430-5.

Verslues P.E, M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu, JK. Zhu (2006). "Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status." *Plant J* **45**(4): 523-539.

Wandelt, C.I, MR. Khan, S. Craig, HE. Schroeder, D. Spencer, TJ. Higgins (1992). "Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants." *Plant J* **2**(2): 181-192.

Xiang, C., P. Han, I. Lutziger, K. Wang, DJ. Oliver (1999). "A mini binary vector series for plant transformation." *Plant Mol Biol* **40**(4): 711-717.

# **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 23.09.2011

Evelyn Rother